



Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento
Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Ultraestructura y función mitocondrial en la
célula cromafín del ratón SOD1^{G93A}
modelo de esclerosis lateral amiotrófica,
en etapas pre-sintomáticas y sintomáticas**

TESIS DOCTORAL

Iago Méndez López

Directores:

Dr. Juan Fernando Padín Nogueira

Dr. Antonio García García

Madrid, 2019



Universidad Autónoma de Madrid

El Dr. **JUAN FERNANDO PADÍN NOGUEIRA**, profesor de farmacología del Departamento de Ciencias Médicas, Facultad de Medicina Ciudad Real, Universidad de Castilla-La Mancha, y el Dr. **ANTONIO GARCÍA GARCÍA**, profesor emérito del Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN:

Que D. **IAGO MÉNDEZ LÓPEZ** ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado: **“Ultraestructura y función mitocondrial en la célula cromafín del ratón SOD1^{G93A} modelo de esclerosis lateral amiotrófica, en etapas pre-sintomáticas y sintomáticas”**, que será presentado como Tesis para optar al Grado de Doctor con mención “Doctor Internacional” por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, expedimos y firmamos la presente en Madrid a 3 de septiembre de 2019.

Fdo.: Prof. Juan Fernando Padín Nogueira

Fdo.: Prof. Antonio García García

A mis padres Mari y Jose, y a mi hermana Ana.

A mi abuela Carmiña,

A mis abuelos Suso, Moncho y Ra, in memoriam.

A Lorena.

AGRADECIMIENTOS

ARTÍCULOS PUBLICADOS

A continuación, se citan los artículos publicados en distintas colaboraciones en temas afines durante la elaboración de esta Tesis Doctoral. Los señalados con asterisco se relacionan con el estudio de la función mitocondrial, o con modelos de ratón de enfermedades neurodegenerativas.

1. * Martínez-Ramírez C, Baraibar AM, Nanclares C, **Méndez-López I**, Gómez A, Muñoz MP, de Diego AMG, Gandía L, Casarejos MJ, García AG. *Altered excitability and exocytosis in chromaffin cells from the R6/1 mouse model of Huntington's disease is linked to over-expression of mutated huntingtin*. J Neurochem. 2018;147:454-476.
2. Nanclares C, Gameiro-Ros I, **Mendez-Lopez I**, Martinez-Ramirez C, Padin-Nogueira JF, Colmena I, Baraibar AM, Gandia Juan L, Garcia Garcia A. *Dual antidepressant duloxetine blocks nicotinic receptor currents, calcium signals and exocytosis in chromaffin cells stimulated with acetylcholine*. J Pharmacol Exp Ther. 2018;367:28-39.
3. de Pascual R, Baraibar AM, **Méndez-López I**, Pérez-Ciria M, Polo-Vaquero I, Gandía L, Ohia SE, García AG, de Diego AMG. *Hydrogen sulphide facilitates exocytosis by regulating the handling of intracellular calcium by chromaffin cells*. Pflugers Arch. 2018;470:1255-1270
4. * Musial DC, Bomfim GH, Arranz-Tagarro JA, **Méndez-López I**, Miranda-Ferreira R, Jurkiewicz A, Jurkiewicz NH, García AG, Padín JF. *Altered mitochondrial function, calcium signaling, and catecholamine release in chromaffin cells of diabetic and SHR rats*. Eur J Pharmacol. 2017;815:416-426.
5. * Losano JDA, Padín JF, **Méndez-López I**, Angrimani DSR, García AG, Barnabe VH, Nichi M. *The Stimulated Glycolytic Pathway Is Able to Maintain ATP Levels and Kinetic Patterns of Bovine Epididymal Sperm Subjected to Mitochondrial Uncoupling*. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:1682393.
6. * **Méndez-López I**, Bomfim GHS, Musial DC, Arranz-Tagarro JA, Velasco-Martín JP, Regadera J, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A, García AG, Padín JF. *Altered mitochondrial function, capacitative calcium entry and contractions in the aorta of hypertensive rats*. J Hypertens. 2017;35:1594-1608.
7. Bomfim GHS, **Méndez-López I**, Fernández-Morales JC, Padín JF, Jurkiewicz A, Jurkiewicz NH, García AG. *Electrophysiological properties and augmented catecholamine release from chromaffin cells of WKY and SHR rats contributing to the hypertension development elicited by chronic EtOH consumption*. Eur J Pharmacol. 2017;803:65-77.
8. Souza Bomfim GH, **Mendez-Lopez I**, Arranz-Tagarro JA, Ferraz Carbonel AA, Roman-Campos D, Padín JF, Garcia AG, Jurkiewicz A, Jurkiewicz NH. *Functional Upregulation of STIM-1/Orai-1-Mediated Store-Operated Ca²⁺ Contributing to the Hypertension Development Elicited by Chronic EtOH Consumption*. Curr Vasc Pharmacol. 2017;15:265-281.
9. * Buendia I, Tenti G, Michalska P, **Méndez-López I**, Luengo E, Satriani M, Padín-Nogueira F, López MG, Ramos MT, García AG, Menéndez JC, León R. *ITH14001, a*

CGP37157-Nimodipine Hybrid Designed to Regulate Calcium Homeostasis and Oxidative Stress, Exerts Neuroprotection in Cerebral Ischemia. ACS Chem Neurosci. 2017;8:67-81.

10. * López-Gil A, Nanclores C, **Méndez-López I**, Martínez C, de Los Rios C, Padín-Nogueira JF, Montero M, Gandía L, García AG. *The quantal catecholamine release from mouse chromaffin cells challenged with repeated acetylcholine pulses is regulated by the mitochondrial Na(+)/Ca(2+) exchanger.* J Physiol. 2017;595:2129-2146.
11. Calvo-Gallardo E, López-Gil Á, **Méndez-López I**, Martínez-Ramírez C, Padín JF, García AG. *Faster kinetics of quantal catecholamine release in mouse chromaffin cells stimulated with acetylcholine, compared with other secretagogues.* J Neurochem. 2016;139:722-736.
12. * Vestring S, Fernández-Morales JC, **Méndez-López I**, C Musial D, G de Diego AM, Padín JF, G García A. *Tight mitochondrial control of calcium and exocytotic signals in chromaffin cells at embryonic life.* Pflugers Arch. 2015;467:2589-601.

AYUDAS DE INVESTIGACIÓN

El trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral fue financiado por las Instituciones Españolas mediante las ayudas económicas concedidas en los siguientes proyectos de investigación al Prof. Antonio G. García y de estudios de doctorado a Iago Méndez López:

1. Ayudas a proyectos de I+D, programa estatal de fomento de la investigación científica y técnica de excelencia. **SAF2013-44108-P**, Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España.
2. Ayudas a proyectos de I+D+I, programa estatal de investigación, desarrollo e innovación orientada a los retos de la sociedad, en el marco del plan estatal de investigación científica y técnica y de innovación 2013-2016, convocatoria 2016. **2016-78892-R**, Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España.
3. Ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores 2014. **BES-2014-069005**, Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España y Fondo Social Europeo.
4. Ayudas a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros de I+D, convocatoria 2016. **EEBB-I-17-12697**, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Gobierno de España.
5. Ayudas a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros de I+D, convocatoria 2017. Referencia: **EEBB-I-18-13033**, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Gobierno de España.

Quisiera agradecer especialmente al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, por la beca predoctoral FPI concedida durante los años 2015-2019 y al continuo apoyo de la Fundación Teófilo Hernando.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Ac	Anticuerpo
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ADNm	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADP	Difosfato de adenosina
ANT	Transportador de nucleótidos de adenina
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Trifosfato de adenosina
Bax	Proteína Bax reguladora de la apoptosis
Bcl-2	Proteína Bcl-2 reguladora de la apoptosis
BSA	Albúmina de suero bovino
C9orf72	Proteína codificada por el gen C9orf72, del inglés " <i>chromosome 9 open reading frame 72</i> "
Ca²⁺	Ión calcio
CAT	Catalasa
CC	Célula cromafín
CCS	Chaperona de cobre para la superóxido dismutasa
CM-H₂DCFDA	6-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato, acetil ester
CTE	Cadena de transporte electrónico
DAPI	4',6-diamindino-2-fenilindol
DFT	Demencia frontotemporal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
Drp 1	<i>Dynamín related protein 1</i>
EAAT2	Transportador de aminoácidos excitatorios 2
EI	Espacio intermembrana
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ELAf	Esclerosis lateral amiotrófica familiar
Em	Espectro de emisión
EMA	Agencia europea de medicamentos
Ex	Espectro de excitación
FADH₂	Dinucleótido de flavina y adenina
FCCP	Carbonilcianuro-4-trifluorometoxifenilhidrazona
FUS	Proteína de unión a ARN " <i>Fused in Sarcoma</i> "
G93A	Sustitución glicina por alanina en el codón 93
Glur2	Subunidad 2 del receptor AMPa de glutamato
GPx	Enzima glutathion peroxidasa
GRs	Enzima glutathion reductasa
GSH	Glutathion
GTP	Trifosfato de guanosina
HD	Enfermedad de Huntington

hSOD1^{G93A}	Proteína superóxido dismutasa 1 humana mutada
HSPs	Proteínas de choque térmico
IL-2	Interleucina 2
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducible
iPSCs	Células madre pluripotentes inducidas
kDa	Kilodalton
KO	Ablación de un gen, generalmente en el ratón. Del inglés “ <i>knockout</i> ”
kV	Kilovoltios
L-OPA1	Isoforma larga de OPA1
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MAMs	Membranas de asociación mitocondrial
Mfn 1 y 2	Proteínas mitofusina 1 y 2
MICOS	Sistema de contacto y organización mitocondrial, del inglés “mitochondrial contact site and organizing system”
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
MN	Motoneurona
mOsm	Miliosmoles
mV	Milivoltios
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NCXm	Intercambiador sodio/calcio mitocondrial
NF-κB	Factor kappa de cadena ligera de sobreexpresión de células B
NOX	Enzima NADPH oxidasa
Nrf2	Factor de transcripción antioxidante, del inglés “ <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i> ”
NSC34	Línea celular neuronal, del inglés “ <i>Mouse Motor Neuron-Like Hybrid Cell Lin</i> ”
O₂⁻	Anión superóxido
OCR	Ratio de consumo de oxígeno, del inglés “ <i>Oxygen Consumption Rate</i> ”
OMA1	Metaloendopeptidasa mitocondrial OMA1
OMS	Organización mundial de la salud
OPA1	Proteína de atrofia óptica
OXPHOS	Sistema de fosforilación oxidativa
P120	Edad sintomática (120 días postnatal)
P30	Edad presintomática (30 días postnatal)
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
PDH	Enzima piruvato deshidrogenasa
PFA	Paraformaldehído
PGC1α	Factor de transcripción coactivador 1α de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas
PINK1	Serina/treonina proteína quinasa mitocondrial codificada por el gen PINK1
PPTM	Poros de permeabilidad transitoria mitocondrial
Ratón C57	Ratón control de la cepa C57BL/6
Ratón SOD1	Ratón modelo de ELA con la mutación SOD1G93A
RE	Retículo endoplásmico
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés “ <i>Reactive Oxygen Species</i> ”
rpm	Revoluciones por minuto

S-OPA1	Isoforma corta de OPA1
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SEM	Error estándar de la media
SFB	Suero fetal bovino
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SOD1	Gen / proteína Superóxido dismutasa 1
SOD1^{G93A}	Mutación G93A en el gen superóxido dismutasa 1
t0	Tiempo 0 minutos
t30	Tiempo 30 minutos
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TDP43	Proteína TAR de unión a ADN de 43 kDa, codificada por el gen TARDBP
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TIM	Translocasa de la membrana mitocondrial interna
TMRE	Tetrametil rodamina etil éster perclorato
TOM	Translocasa de la membrana mitocondrial externa
UAF	Unidades arbitrarias de fluorescencia
UCP	Proteínas desacoplantes mitocondriales
UPS	Sistema ubiquitín-proteasoma
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
Yme1l	Proteasa mitocondrial Yme1l
Ψ_m	Potencial de membrana mitocondrial

ÍNDICE

ÍNDICE

Agradecimientos.....	i
Artículos publicados	iii
Ayudas de investigación	v
Abreviaturas y Acrónimos.....	vii
ÍNDICE.....	XI
MARCO Y JUSTIFICACIÓN	1
Marco y justificación de la Tesis Doctoral.....	3
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN.....	13
1. Esclerosis Lateral Amiotrófica	15
1.1. Etiología.....	16
1.2. La ELA familiar	17
1.3. Fisiopatología de la ELA.....	17
1.4. Tratamiento de la ELA	21
1.5. Modelos para el estudio preclínico de la ELA.....	23
2. Ratón SOD1 ^{G93A}	26
3. Proteína SOD1 humana.....	27
4. Consecuencias de la mutación SOD1 ^{G93A}	29
5. La mitocondria	30
5.1. La dinámica y la arquitectura mitocondrial.....	33
5.2. Dinámica y arquitectura de la membrana mitocondrial interna/crestas	36
5.3. Determinantes moleculares de la topología de la MMI y crestas	37
5.4. Funciones de la mitocondria	41
6. Enfermedades mitocondriales.....	43
7. Mitocondria y ELA.....	44
8. SOD1 ^{G93A} y mitocondria.....	46
9. Bioenergética en ELA	47
9.1. Metabolismo en SNC: neuronas y glía.....	48
10. La glándula adrenal.....	50
11. La célula cromafín	51
11.1. Funciones de la célula cromafín.....	52
11.2. La célula cromafín como modelo de estudio en investigación básica y en enfermedades neurodegenerativas.....	53
12. Afectación del eje simpato-adrenal en la ELA	55
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59
MATERIALES Y MÉTODOS	63
1. Instrumentación y equipos.....	65
2. Reactivos y productos químicos	66
3. Soluciones	67
4. Programas informáticos	67
5. Aprobación ética.....	68
6. Animales.....	68
7. Genotipado y mantenimiento de la colonia.....	69
8. Rotarod	71
9. Cultivo de células cromafines de ratón.....	71
10. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	72

Análisis ultraestructural de la mitocondria	73
11. Inmuno-oro	74
12. Potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m)	74
13. Estudio de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	76
14. Estudio de la bioenergética celular	77
15. Inmunofluorescencia en células	79
16. Western blot	81
17. Análisis estadístico y representación de los datos	84
RESULTADOS	85
1. Genotipado y control de la colonia de ratones SOD1 ^{G93A}	87
2. Expresión de la proteína hSOD1 ^{G93A}	89
2.1. La célula cromafín de los ratones transgénicos expresan la enzima SOD1 con la mutación patológica humana G93A (hSOD1 ^{G93A}), y aumenta con el progreso de la patología	89
3. Análisis morfológico de la mitocondria	91
3.1. Daño mitocondrial en la célula cromafín del ratón SOD1 ^{G93A}	92
3.2. La dinámica mitocondrial se encuentra alterada en la célula cromafín del ratón SOD1 ^{G93A} , presentando una fusión disminuida desde estados presintomáticos	95
3.3. Alteración en la estructura de crestas mitocondriales	97
3.4. Incremento del tamaño del anclaje de crestas	99
4. Análisis funcional de la mitocondria	101
4.1. El potencial de membrana mitocondrial está disminuido en las CC del ratón SOD1 ^{G93A} desde etapas presintomáticas	101
4.2. La célula cromafín del ratón SOD1 ^{G93A} presenta un mayor estrés oxidativo celular desde edades presintomáticas, que se incrementa con la edad y con el desarrollo de la enfermedad	104
4.3. Alteraciones en la bioenergética celular en la CC del modelo SOD1 ^{G93A}	106
5. Relación hSOD1 ^{G93A} y mitocondria	108
5.1. La enzima mutada SOD1 ^{G93A} se localiza en la mitocondria y su colocalización se triplica durante el desarrollo de la enfermedad	108
6. Estudio de expresión proteica	112
6.1. La proteína OPA1, clave en la fusión mitocondrial, está disminuida en la CC del ratón SOD1 ^{G93A}	112
6.2. Las proteínas ubiquitinadas en la médula suprarrenal están disminuidas en el modelo SOD1, mientras que la proteína Bax no cambia su expresión	113
DISCUSIÓN	115
1. El daño en la ultraestructura mitocondrial, el primer evento descrito en ELA, también se presenta en las células cromafines de los ratones SOD1 ^{G93A}	117
2. La alteración del sistema MICOS afecta a la ultraestructura de las uniones de cresta	118
3. La alteración en las uniones de cresta y del sistema MICOS tiene como consecuencia la afectación del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m)	119
4. Las alteraciones en el Ψ_m , la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva, evidencian la ineficiencia de OXPHOS	120
5. El desequilibrio en el sistema OXPHOS, la ganancia tóxica de función de SOD1G93A y la alteración en la homeostasia redox son los principales mecanismos de generación de radicales libres	121
6. Las alteraciones mitocondriales observadas están causadas por proteínas del complejo MICOS que participan en la homeostasia mitocondrial, como OPA1	124

7.	La acumulación y agregación de SOD1G93A en las mitocondrias altera las proteínas implicadas en la homeostasia mitocondrial.....	127
8.	Alteración metabólica y disfunción mitocondrial en ELA.....	130
CONCLUSIONES		137
CONCLUSIONS		141
REFERENCIAS.....		145
ANEXOS.....		163

MARCO Y JUSTIFICACIÓN

MARCO Y JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

El trabajo de investigación que se presenta en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Instituto Fundación Teófilo Hernando de I+D del medicamento (IFTH) y el Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Las principales líneas de investigación del grupo, dirigido por el Profesor Antonio García García desde la década de los 80 del siglo pasado, son el estudio prioritario de la neurotransmisión-neuroprotección y, más secundariamente, el estudio del sistema cardiovascular.

Para el estudio de la neurotransmisión, el grupo ha desarrollado e impulsado el uso de las técnicas electrofisiológicas y de imagen de fluorescencia, especialmente aplicadas a la célula cromafín de la médula adrenal. Las aportaciones científicas más relevantes se sitúan alrededor de la caracterización de los canales de calcio dependientes de voltaje, estudio de la dinámica del calcio durante el proceso de acoplamiento estímulo-secreción, y la regulación de la exocitosis mediada por la triada que forman los canales de calcio dependientes de voltaje, el retículo endoplásmico y la mitocondria. Con la aparición de los modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, el grupo se ha esforzado en intentar descifrar los cambios que se producen en la neurotransmisión durante el desarrollo de la enfermedad, y en desarrollar moléculas que ejerzan efectos neuroprotectores. Para ello, se han aplicado los conocimientos adquiridos durante tantos años de estudio de la fisiología de estos procesos, y se han descrito importantes alteraciones en modelos de enfermedad de Alzheimer, de Huntington y de esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Uno de los descubrimientos más relevantes en estos modelos es la descripción de patrones característicos en la cinética de secreción de neurotransmisores, gracias al estudio del poro de fusión exocitótico. Mientras que en el modelo de ELA SOD1^{G93A} la liberación de catecolaminas es más lenta y de mayor contenido cuántico (Calvo-Gallardo et al., 2015), en el modelo de alzheimer APP/PS1 la exocitosis es más rápida y de menor contenido cuántico (de Diego et al., 2012); por su parte, en el modelo de Huntington R6/1 es más lenta y de menor contenido cuántico (Martinez-Ramirez et al., 2018).

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral continúa la investigación iniciada en el modelo de ELA, centrándonos en la afectación de la célula cromafín en etapas presintomáticas. El descubrimiento de que las alteraciones morfológicas de la mitocondria preceden a las

alteraciones de la exocitosis, de la excitabilidad y de las principales corrientes iónicas, ha sido el punto de partida de este trabajo. Hemos estudiado la mitocondria en la célula cromafín del ratón modelo de ELA SOD1^{G93A} a nivel ultraestructural y funcional, tanto en etapas presintomáticas como sintomáticas.

La disfunción mitocondrial en la ELA es conocida, pero todavía existen muchas incógnitas acerca de su origen, su repercusión en la enfermedad y su participación en la muerte selectiva de la motoneurona. El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral intenta por tanto esclarecer algunas de estas incógnitas utilizando como modelo la célula cromafín.

RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por una afectación rápida de la motoneurona (MN) de los núcleos motores superiores e inferiores; ello provoca una parálisis muscular progresiva que avanza hasta el fracaso respiratorio que conduce a la muerte del paciente en 3 a 5 años. El 90 % de los casos son esporádicos, mientras que el 10 % restante se han relacionado con mutaciones genéticas hereditarias, la denominada ELA familiar (ELAf). Gracias al desarrollo de modelos animales basados en estas mutaciones, se ha conseguido avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, siendo el modelo SOD1^{G93A} el primero descrito y más estudiado. Se trata de una mutación en la enzima citosólica superóxido dismutasa 1 (SOD1), encargada del control del balance redox celular, mutación que acontece en el 20 % de los pacientes de ELAf.

A día de hoy, se ha abordado la enfermedad a través de todos los mecanismos fisiopatológicos descritos (alteraciones en la transcripción y en el procesamiento de los ARN, alteraciones en el metabolismo proteico, excitotoxicidad y alteración de la homeostasia del calcio, estrés oxidativo, alteración del citoesqueleto y del transporte axonal, disfunción mitocondrial o neuroinflamación); sin embargo, no se ha logrado una cura eficaz, y tan solo se ha aprobado un tratamiento (riluzol) que consigue aumentar en dos meses el tiempo hasta la intubación del paciente, no teniendo efectos sobre la supervivencia. Además, aunque la afectación selectiva de la motoneurona sigue siendo una incógnita, se empieza a esclarecer la implicación de otros tipos celulares como la glía o el músculo.

En el presente trabajo hemos centrado nuestra investigación en la mitocondria, pues se trata de un elemento central de toda la fisiopatología conocida. Hemos utilizado como modelo la célula cromafín (CC) del ratón SOD1^{G93A}, por ser un interesante modelo de estudio de neurosecreción y de excitabilidad celular en el que ya hemos encontrado alteraciones en estados avanzados de la enfermedad. Ello nos puede ayudar a entender lo que sucede a nivel de mecanismos básicos, en la motoneurona, así como su relación con otros tipos celulares en el desarrollo de la ELA. Analizando tanto la estructura como la función mitocondrial en la CC de ratones a edad presintomática (P30) y sintomática (P120), hemos descubierto que con el desarrollo de la enfermedad existe un déficit en la fusión mitocondrial, pues el ratón transgénico presenta mayor número de mitocondrias pero de menor tamaño. Ultraestructuralmente destaca el hinchamiento de crestas acompañado de un mayor tamaño de las uniones de cresta, lo que repercute en un menor potencial de membrana mitocondrial. Estas alteraciones mitocondriales conducen a un cambio en el perfil bioenergético de la CC,

pues se reduce la capacidad respiratoria máxima así como la de reserva bioenergética, impidiendo abastecer a la célula ante situaciones de gran demanda de energía y manteniendo unos niveles basales a costa de un consumo excesivo e ineficiente de sustratos. Además, aunque hemos confirmado una mayor generación de radicales libres, el menor consumo de oxígeno no mitocondrial pone de manifiesto la disfunción en rutas importantes para mantener la defensa antioxidante, pero también de rutas generadoras de ROS. Por lo tanto, la disfunción mitocondrial junto a la acción directa de la enzima mutada, se postulan como principales causantes del estrés oxidativo celular; ello se puede explicar por una alta expresión de la enzima mutada en la CC, que se acumula con la edad y colocaliza en la mitocondria. Finalmente, hemos caracterizado una menor expresión de la proteína mitocondrial OPA1, clave en la dinámica de la mitocondria y sus crestas, pero sin alteraciones en el procesamiento de sus isoformas, lo que parece indicar que existe un cambio a nivel de expresión, condicionado por el ambiente altamente oxidativo. Todos estos parámetros están alterados en la CC desde antes del inicio de los síntomas y se agravan con la instauración de la enfermedad.

Por lo tanto, podemos concluir que en el modelo de ELA familiar SOD1^{G93A} la afectación no es exclusiva de la motoneurona, puesto que existe también un deterioro de la CC desde etapas presintomáticas. Hemos identificado las alteraciones morfológicas mitocondriales que tienen una repercusión funcional, señalando a la proteína OPA1 como un actor principal en el proceso, y poniendo de manifiesto la importancia del metabolismo celular en el daño que se produce durante el desarrollo de la ELA. La importancia de este estudio, es que integra por vez primera el conjunto de la fisiopatología mitocondrial derivada de la mutación de la enzima SOD1 en un tipo celular no motoneuronal derivado del modelo murino SOD1^{G93A}, tanto en estadios iniciales como finales de la enfermedad. Asimismo, se hace una conexión entre morfología, función, bioenergética y estrés oxidativo. La relación de nuestros resultados con los datos obtenidos en la motoneurona y otros tipos celulares como glía o músculo, demuestra que no entenderemos lo que sucede realmente en la ELA si no valoramos los distintos tipos celulares afectados, en función de su fenotipo metabólico.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by a rapid loss of the upper and lower motor neurons, causing progressive muscular paralysis that progresses to respiratory failure and death of the patient in 3 to 5 years. 90 % of cases are sporadic, while the remaining 10 % have been related to hereditary genetic mutations, the so-called familial ALS (fALS). Important progress in the knowledge of the pathophysiology of the disease has been made thanks to the development of animal models based on these mutations. The SOD1^{G93A} model was the first described and most studied, which carries a mutation in the cytosolic enzyme superoxide dismutase 1 (SOD1) responsible for the control of the cellular redox balance. This mutation occurs in 20 % of ALS patients.

Up until now, disease study has been addressed through all the pathophysiological mechanisms described (alterations in the transcription and processing of RNAs, alterations in protein metabolism, excitotoxicity and alteration of calcium homeostasis, oxidative stress, alteration of the cytoskeleton and axonal transport, mitochondrial dysfunction or neuroinflammation). However, an effective cure has not been achieved and only one treatment (riluzole) has been approved which delays the time to patient intubation by two months, having no effect on patient survival. Moreover, although selective motor neuron involvement remains unknown, the involvement of other cell types such as the glia or muscle begin to be clarified.

In the present work, we have focused our research on mitochondria as a central element of all known pathophysiology. We have used the chromaffin cell (CC) of the SOD1^{G93A} mouse model, an interesting model for the study of neurosecretion and cell excitability in which we have already found alterations in advanced stages of the disease. This could help us understand what happens at the level of basic mechanisms, as well as its relationship with other cell types in the development of ALS. Analyzing both the structure and mitochondrial function in the CC of mice at presymptomatic (P30) and symptomatic (P120) stages, we have discovered that there is a deficit in mitochondrial fusion during the development of the disease. Thus, the transgenic mouse has a greater number of mitochondria but smaller sized. The alterations of the mitochondria ultrastructure highlights the swelling of cristae followed by a greater size of cristae junctions, which produce a decrease in the mitochondrial membrane potential. These mitochondrial alterations lead to a change in the bioenergetic profile of the CC, since the maximal respiration as well as the spare respiratory capacity is reduced. This condition prevents supplying the cell with ATP in situations of high energy demand and forces to

maintain baseline levels at the expense of excessive and inefficient consumption of substrates. In addition, although we have confirmed a greater generation of free radicals the lower consumption of non-mitochondrial oxygen shows the dysfunction of important routes to maintain the antioxidant defense, but also of ROS generating routes. Therefore, mitochondrial dysfunction and the direct effect of the mutated enzyme are postulated as the main causes of cellular oxidative stress. This can be explained by a high expression of the mutated enzyme in the CC, which accumulates with aging and is located in the mitochondria. Finally, we have characterized a lower expression of the mitochondrial protein OPA1, a key protein in the mitochondria and cristae dynamics, but without alterations in the processing of their isoforms. Therefore, these alterations seem to indicate that there is a change at the level of expression, influenced by the highly oxidative environment. All these parameters are altered in the CC from before the beginning of the symptoms and are aggravated with the course of the disease.

Therefore, we can conclude that in the fALS model SOD1^{G93A} the damage is not solely to the motor neurons, since there is also a deterioration of the CC from presymptomatic stages. We have identified the mitochondrial morphological alterations that have a functional impact, pointing out the OPA1 protein as a major actor in the process, and highlighting the importance of cellular metabolism in the damage that occurs during the development of ALS. The relevance of this study is that it integrates for the first time the set of mitochondrial pathophysiology features derived from the mutation of the SOD1 enzyme in a non-motor neuron cell type, derived from the murine model SOD1^{G93A}, both in the initial and final stages of the disease. In addition, we perform a connection between morphology, function, bioenergetics and oxidative stress. The relationship of our results and the data obtained in motor neurons and other cell types such as glia or muscle, shows that we will not understand what really happens in ALS if we do not evaluate the different cell types affected depending on their metabolic phenotype.

INTRODUCCIÓN

1. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que se produce por una degeneración rápida y progresiva de la neurona motora, tanto en los núcleos superiores (primera motoneurona) como inferiores (segunda motoneurona). Esto se traduce en un déficit de los impulsos nerviosos que llegan a los músculos, los cuales terminan sufriendo una atrofia grave que impide su función. El síndrome de déficit motor que se produce en la ELA, se comparte con otras enfermedades neurológicas denominadas enfermedades neuromusculares. Según la Clasificación Internacional de Enfermedades de la OMS, la ELA se clasifica como una enfermedad de la neurona motora. Epidemiológicamente, en Europa la ELA tiene una incidencia de 1-2,6:100.000 habitantes, siendo ligeramente superior en hombres que en mujeres (Kiernan et al., 2011).

La ELA fue descrita por primera vez en la lección 12 de la obra *Leçons sur les maladies du système nerveux faites à la Salpêtrière* (1877), escrita por el neurólogo francés Jean Martin Charcot, aunque fue Charles Bell quien inició su caracterización ya en el 1830. El profesor Charcot junto al Dr. Joffroy descubrieron que las lesiones en el asta anterior de la médula espinal cursaban con parálisis crónica progresiva, acompañada de contracturas sin atrofia muscular; sin embargo, las lesiones que se producían en el asta anterior de la médula espinal producían parálisis sin contracturas, lo que conducía a una atrofia muscular. Etimológicamente, el término de esclerosis lateral amiotrófica hace referencia a un endurecimiento (esclerosis) de la zona de la médula espinal afectada (lateral), que conducen a una degeneración del músculo: “a-”, negación, privación, carencia de; “-mio-”, músculo; y “-trofia”, desarrollo o nutrición.

El inicio de la enfermedad se produce a los 58-60 años, mientras que en las formas familiares se produce 10 años antes, y la supervivencia media es de 3 a 5 años. El rápido desarrollo y fatal desenlace de la enfermedad provoca que más del 95 % de los pacientes fallezcan entre los 3 y 9 años de su diagnóstico. En España se estima que actualmente hay 4000 afectados de ELA, pero cabe mencionar que, al presentarse una alta y rápida mortalidad, los datos de prevalencia son muy bajos respecto a otras enfermedades con una incidencia similar.

Los síntomas y signos de la ELA no responden a un patrón único, siendo el inicio y la progresión diferentes en cada paciente. Esta variabilidad clínica, junto a la ausencia de biomarcadores, dificulta el diagnóstico de la ELA. La afectación de las motoneuronas

inferiores produce paresia (debilidad muscular), atrofia muscular, fasciculaciones (contracciones espontáneas), calambres, hipotonía (pérdida de tono muscular) y arreflexia (ausencia de reflejos). La afectación de la primera motoneurona, o neurona motora superior, produce debilidad muscular, espasticidad, hiperreflexia y labilidad emocional. La ELA de origen bulbar (20 % de los casos) mantiene una progresión más rápida (fracaso respiratorio en 2-3 años) y afecta inicialmente al habla y la deglución; mientras que la ELA de origen espinal progresa más lentamente (fracaso respiratorio en 3-5 años), afectando en un primer momento a las extremidades (Wijesekera and Leigh, 2009). La parálisis total de la musculatura esquelética puede instaurarse en 2-5 años. Respecto a la función cognitiva, se ha visto que el 14 % de los pacientes desarrollan demencia frontotemporal (DFT) y hasta la mitad de los enfermos desarrolla trastornos cognitivos y de comportamiento clínicamente significativos, sobre todo en las etapas finales de la enfermedad (Lomen-Hoerth et al., 2002, Phukan et al., 2012, Goldstein and Abrahams, 2013, Crockford et al., 2018). La función sensorial parece no estar afectada en la mayoría de los casos, y curiosamente, tampoco parecen estar afectadas las neuronas motoras que inervan el músculo oculomotor y los esfínteres.

Los neurólogos deben realizar un diagnóstico diferencial para descartar otras posibles patologías, y se apoyan en una serie de criterios clínicos que fueron recogidos en un primer momento en los “criterios de El Escorial” (Brooks, 1994) tras una reunión de la Federación Mundial de Neurología en Madrid (1990); posteriormente fueron revisados y actualizados en los “criterios de Awaji” (de Carvalho et al., 2008), que incluían además de los signos clínicos, el uso de datos obtenidos mediante electromiografía, aumentando así su sensibilidad diagnóstica. Recientemente, se publicó un nuevo trabajo en el que se desarrolló un nuevo índice diagnóstico (ALSDI), que mejora los resultados aplicando los criterios Awaji (Geevasinga et al., 2019).

1.1. Etiología

El 90 % de los casos de ELA son de origen desconocido y se clasifican como “ELA esporádica”. El 10 % restante de los pacientes, presentan una forma de la enfermedad heredada (ELA familiar o ELAf). Se han implicado más de 30 genes con la ELA (<http://alsod.iop.kcl.ac.uk>); las mutaciones en esos genes provocan hasta un 75 % de las formas ELAf (Chia et al., 2018). Se han perseguido varias hipótesis sobre su origen, pero sin éxito; algunas de ellas se relacionan con la de exposición a tóxicos ambientales, la hipótesis vírica

relacionada con el virus de la polio y con otras infecciones, los traumatismos físicos, el ejercicio físico intenso o la dieta. Actualmente la hipótesis más aceptada es la de un origen multifactorial por interacción de varios mecanismos patogénicos que culminan en la neurodegeneración (Bruijn et al., 2004, Shaw, 2005). De esta manera, los únicos factores de riesgo establecidos son los genéticos (con un patrón de herencia principal autosómica dominante) y la edad, como ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas.

1.2. La ELA familiar

El primer gen causante de ELAf fue identificado en 1993 (Rosen et al., 1993). Se trataba del gen que codifica la enzima SOD1 (locus 21q22.11), en el que actualmente se describieron más de 150 mutaciones relacionadas con la ELA y que representan hasta 20 % de los casos de ELAf. No obstante, el gen más prevalente en ELA (40 % de los casos de ELAf y 8 % de ELA esporádico) es el más recientemente descrito C9orf72, donde una mutación produce una expansión anómala del hexanucleótido CCCCCG (DeJesus-Hernandez et al., 2011, Renton et al., 2011). Además, esta expansión también se asocia en un gran porcentaje a la demencia frontotemporal (DFT). Este descubrimiento ha relacionado a las dos patologías pues la comorbilidad ELA-DFT en tan alto porcentaje provocó que incluso se consideren casos como ELAf si un familiar de un paciente ELA sufre DFT. En el **Anexo 1** se resumen en una tabla los genes identificados y relacionados con la ELA, la proteína que codifican, y la vía de señalización intracelular en la que están implicados.

1.3. Fisiopatología de la ELA

La etiología de la degeneración de la motoneurona sigue sin estar esclarecida. La gran variedad de vías afectadas pone de manifiesto la complejidad de la enfermedad y las dificultades para su estudio y tratamiento. Algunas de las alteraciones descritas quedan limitadas por la mutación que las produce. En estos casos se producen daños específicos y relativamente más sencillos de abordar, comparado con otras alteraciones que se producen en pasos clave de la homeostasia general del organismo. En este sentido, las alteraciones en el estrés oxidativo o la disfunción mitocondrial tienen como resultado un daño celular generalizado, afectando al resto de vías indirectamente. A continuación se describen las principales vías celulares afectadas en la ELA, que contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad (Mancuso and Navarro, 2015, Hardiman et al., 2017, Van Damme et al., 2017), aunque en muchos casos es difícil saber si son causa o consecuencia (**Figura 1**).

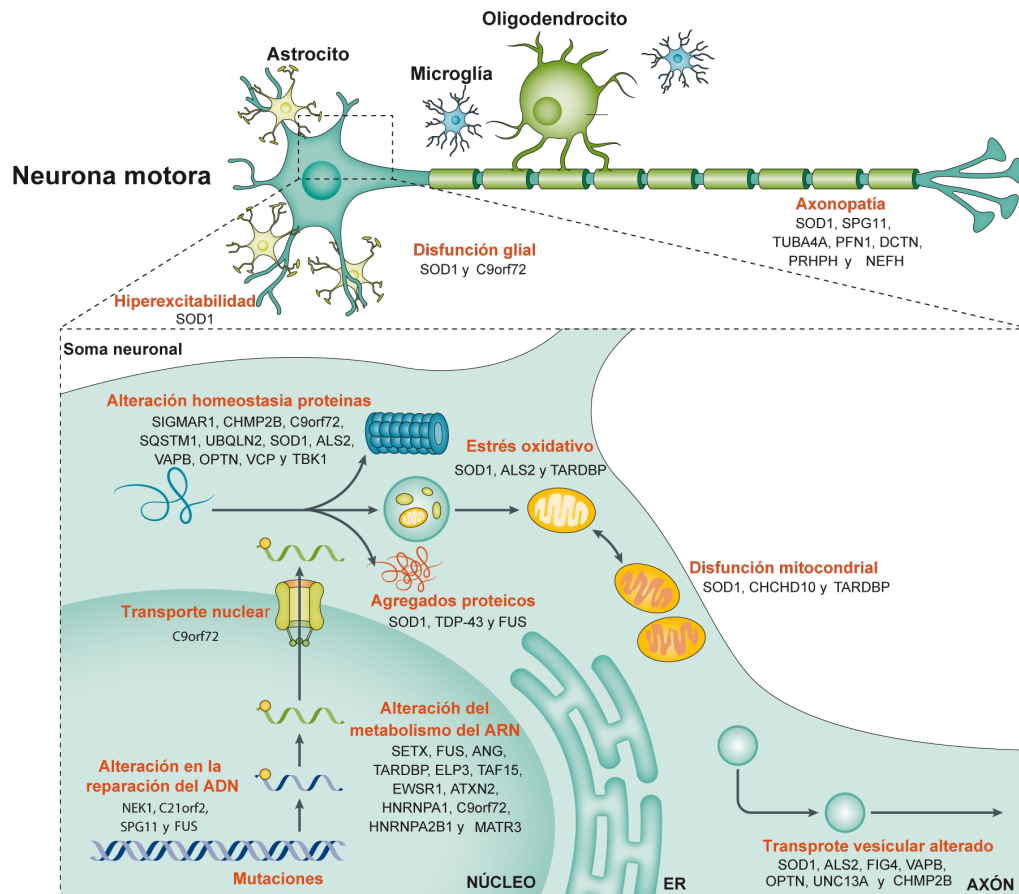


Figura 1. Esquema de los mecanismos fisiopatológicos descritos en la motoneurona. Debajo de cada vía implicada, se muestran los genes en los que sus mutaciones se han relacionado con la alteración. Figura modificada de Hardiman et al., 2017.

a) Factores genéticos: En la ELA se han asociado mutaciones en más de 30 genes, siendo los principales causantes: SOD1, C9orf72, TDP-43 y FUS. Variaciones estructurales y funcionales en la proteína que codifican induce una cascada de alteraciones en la homeostasis celular que terminan siendo mortales para la célula; y en la ELA la mayoría de los daños celulares se han esclarecido en gran parte con modelos murinos y celulares que presentan alguna de estas mutaciones.

b) Metabolismo ARN (alteraciones transcripcionales y en el procesamiento de los ARN): En la ELA, se considera que existe una alteración del metabolismo del ARN, que sucede en varias etapas como el procesamiento (corte y empalme del pre-ARNm), su transporte y su traducción. Las mutaciones en TDP-43, FUS o C9orf72 están relacionadas con estas alteraciones. Tanto TDP-43 como FUS, implicadas en la transcripción y procesamiento del ARN en el núcleo, migran hacia el citoplasma en situaciones de estrés y forman agregados o gránulos de estrés. Estos agregados reclutan distintos ARNm debido a que contienen dominios

“*prion like*”; por lo tanto, el daño celular se produce por la falta de su función en el núcleo, por secuestrar otras moléculas y por formar agregados citoplasmáticos.

c) Alteraciones en el metabolismo proteico: Se han descrito alteraciones tanto en la síntesis como en la degradación de proteínas (proteostasia). El control de calidad de las proteínas sintetizadas se realiza en el retículo endoplásmico (RE), que se ha visto afectado en la ELA, mostrando estados de estrés, activación de mecanismos de muerte celular y alteración en niveles de chaperonas. La degradación de las proteínas queda a cargo del sistema ubiquitín-proteasoma (UPS) así como del sistema autofagia-lisosomal, que también se ha visto alterado. Una característica histopatológica de la ELA es la acumulación de oligómeros o inclusiones proteicas como SOD1, TDP43 o FUS. Estas inclusiones son de mayor intensidad en la zona de inicio de la enfermedad y parece que se propagan por el organismo con el avance de la enfermedad afectando a células vecinas, tanto a través de contactos célula-célula como a través del medio extracelular mediante procesos de exocitosis en vesículas y posterior fagocitosis/pinocitosis (Munch et al., 2011, Sabado et al., 2014). Esta diseminación de la enfermedad no se limita a una propagación neurona-neurona, pues se ha demostrado que puede tener como origen los astrocitos. Así, los astrocitos de pacientes ELA resultaron tóxicos en motoneuronas de pacientes sanos (Haidet-Phillips et al., 2011). Esta toxicidad disminuyó en el caso del KO para SOD1, mientras que en estudios donde se sobreexpresó la proteína se indujo una mayor liberación de exosomas (Basso et al., 2013). Además, los agregados insolubles de estas proteínas parecen funcionar como núcleo de agregación de más proteínas, incluida la agregación de la proteína SOD1 fisiológica (Chia et al., 2010). Por lo tanto, existe la hipótesis de que el mecanismo detrás del desarrollo de la ELA sea de tipo priónico, a diferencia de que en el caso de la ELA no es una patología infecciosa como son este tipo de enfermedades (Lee and Kim, 2015, Munch et al., 2011). Este punto de vista animó a desarrollar tratamientos basados en anticuerpos contra la enzima mutada, pues se comprobó que algunos de ellos aumentaban la supervivencia en el ratón SOD1^{G93A} (Gros-Louis et al., 2010).

d) Excitotoxicidad y alteración de la homeostasia del calcio: Las investigaciones en ELA han demostrado una alteración en la neurotransmisión excitatoria mediada por glutamato a nivel de la motoneurona. Como mecanismo se ha señalado tanto una mayor sensibilidad al neurotransmisor, como una menor recaptación por parte de los astrocitos (que presentan una menor expresión del transportador de aminoácidos excitatorios 2, EAAT2). El daño se produce debido a que las alteraciones en la subunidad Glur2 del receptor AMPA lo

vuelven más permeable al calcio, que alcanza concentraciones tóxicas para la célula. También se ha descrito una disminución en la expresión de proteínas tamponadoras de calcio, lo que empeora la situación y aumenta la toxicidad (Hardiman et al., 2017).

e) Estrés oxidativo: Cuando se pierde el equilibrio entre la formación y eliminación de especies reactivas de oxígeno hacia un ambiente oxidante, o cuando no funcionan los mecanismos de reparación del daño por radicales libres, la célula entra en un estado de estrés que puede alterar la funcionalidad de numerosas vías celulares (como la agregación proteica, estrés del RE o disfunción mitocondrial) hasta inducir su muerte. Análisis de tejidos, sangre, orina y líquido cefalorraquídeo en pacientes con ELA y en modelos animales han mostrado marcadores de daño por radicales libres elevado, como la mayor carbonilación de proteínas o nitración de tirosinas. El gran metabolismo aeróbico de la motoneurona puede hacerlas más susceptibles a este tipo de daño, en comparación a otros tipos celulares. Además, se trata de un daño que se acumula con la edad y se agrava por ser células que no presentan recambio.

f) Alteración del citoesqueleto y del transporte axonal: Una pequeña alteración en el transporte de elementos celulares a lo largo del axón (como vesículas de exocitosis/endocitosis o mitocondrias) puede tener graves consecuencias en la función y viabilidad celular.

g) Disfunción mitocondrial: La mitocondria mantiene un papel principal en el control de procesos celulares vitales, como la producción de energía, la homeostasia del calcio o la muerte programada. La motoneurona es una célula excitable muy activa, por lo que su alta demanda metabólica está obligada a depender en gran medida de la respiración mitocondrial para nutrir sus necesidades energéticas, siendo por tanto muy sensibles a un daño mitocondrial. El largo y activo transporte axonal es energéticamente muy costoso; además, la propagación del potencial de acción implica a la bomba Na^+/K^+ ATPasa y la sinapsis es un lugar con alto consumo de energía. Se ha descrito la presencia de disfunción mitocondrial tanto en numerosos modelos animales como en pacientes de ELA: agregados de proteínas, morfología alterada, déficit de en la capacidad tamponadora de calcio, deficiencia en la cadena de transporte electrónico, daño por estrés oxidativo, activación de caspasas proapoptóticas o alteración en el transporte axonal de mitocondrias (Hardiman et al., 2017). El hecho de que la disfunción mitocondrial sea una vía común que puede desencadenar tantas alteraciones celulares, así como los descubrimientos de que en algunos modelos ya está alterada a etapas

presintomáticas, hacen de la mitocondria una diana muy interesante para el tratamiento de la ELA. Esta alteración fisiopatológica será objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.

h) Neuroinflamación: Además de las alteraciones de las motoneuronas, cada vez hay más evidencias de que en los mecanismos fisiopatológicos de la ELA participan las células que sirven de soporte a la motoneurona, como los astrocitos y los oligodendrocitos (Brites and Vaz, 2014). También se ha descrito la activación microglial e infiltración linfocitaria, así como concentraciones altas de citoquinas y mediadores de inflamación (Corcia et al., 2012). Esto indica un estado de neuroinflamación elevado que puede exacerbar el daño neuronal.

i) Singularidad neuronal: la vulnerabilidad de la motoneurona en la ELA es mayor que la de otros tipos celulares (Shaw, 2005, Ferraiuolo et al., 2011). No obstante, es pertinente destacar que existen motoneuronas más resistentes a la progresión de la enfermedad, caso de las resistentes a la fatiga y las oculomotoras (Nijssen et al., 2017). Entre las características singulares de las motoneuronas que pueden explicar su vulnerabilidad, podemos citar: gran tamaño celular con axones largos y de gran volumen; alta demanda metabólica por vías aeróbicas (altamente oxidantes e inductoras de estrés oxidativo) y depósitos de energía limitados (Vandoorne et al., 2018); alta sensibilidad a glutamato (Williams et al., 1997); baja expresión de proteínas quelantes de calcio citosólicas (Ince et al., 1993); alta expresión de proteínas de defensa frente al estrés oxidativo como por ejemplo SOD1; baja capacidad de respuesta de choque térmico y actividad de chaperonas; y carencia de recambio celular, al tratarse de células que no son proliferativas.

1.4. Tratamiento de la ELA

Después de transcurrir más de 140 años desde la primera descripción de la ELA, solo un fármaco, el riluzol, ha sido aprobado en Europa para su tratamiento y esto ha ocurrido en 1996. Si bien este fármaco no cura la ELA, sí ha demostrado enlentecer modestamente el trascurso de la enfermedad, y prolongar la mediana de supervivencia aproximadamente dos meses (Miller et al., 2012). El mecanismo de acción descrito se centra en disminuir la excitotoxicidad por glutamato por su propiedades antiglutamatérgicas (Wokke, 1996) y bloquear la corriente de sodio persistente (Urbani and Belluzzi, 2000). No obstante, la agencia regulatoria japonesa en 2015, y dos años más tarde la americana (FDA) han aprobado el uso de un fármaco con propiedades antioxidantes, el edaravone, que todavía no ha sido aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) debido a dudas sobre su eficacia y la gran

restricción de ensayos clínicos realizados. En el **Anexo 2**, se pueden ver los principales compuestos probados en ensayos clínicos para el tratamiento de la ELA, clasificados por su mecanismo de acción.

Por lo tanto, a día de hoy la principal vía de actuación en estos pacientes es mediante un soporte sintomático y asistencial óptimo, para prevenir las complicaciones y mantener en la medida de lo posible su calidad de vida. A la vista de este fracaso farmacológico, es imprescindible seguir impulsando la investigación básica que ayude a dar luz al tratamiento de la ELA. De todos ellos, los fármacos con un desarrollo más avanzado pero que finalmente han fracasado en su autorización son el mastinib, un inhibidor de tirosina quinasa en mastocitos y macrófagos; el tirasemtiv, que activa la troponina muscular aumentando su sensibilidad por calcio y el arimoclomol, que activa la respuesta de choque térmico actuando sobre Hsp70. Como terapia experimental, las principales moléculas que se están utilizando hoy en día se resumen en la **Tabla 1**, junto a su mecanismo de acción, que nos orienta sobre las directrices que se están siguiendo en la búsqueda de la cura para la ELA.

Tabla 1. Principales moléculas utilizadas como tratamiento experimental en pacientes con ELA. (recuperado de <https://alsnewstoday.com/experimental-treatments-als/>).

Molécula	Compañía	Mecanismo acción
H.P.Acthar Gel (Corticotropin)	Mallinckrodt Pharmaceuticals	Hormona adrenocorticotrópica purificada. Los estudios sugieren que previene la neuroinflamación actuando sobre el sistema inmune.
MN-166 (ibudilast)	MediciNova	Antiinflamatoria y neuroprotectora.
GM604	Gervon	Péptido natural regulador maestro del sistema nervioso.
AMX0035	Amylyx	Combinación de fenilbutirato de sodio y ácido taurodeoxicólico. Reduce la muerte celular e inflamación bloqueando vías de señalización celulares.
Gilenya (fingolimod)	ASL Therapy Development Institute	Inhibe señalización por el receptor de esfingosina1, mediador de inflamación. Aprobado para esclerosis múltiple.
IONIS-SOD1Rx (BIIB067)	Ionis Pharmaceuticals y Biogen	Reduce los niveles tóxicos de proteína SOD1.
Orph-001 (arimoclomol)	Orphazyme y la Universidad de Miami	Actúa sobre las proteínas de choque térmico.
AT-1501	Anelixis Therapeutics	Anticuerpo que bloquea la proteína CD40L en las células T, que se cree está sobreactivada en ELA y de esta manera bloquea la neuroinflamación.
NP001	Neuraltus	Destinado a reducir la inflamación inactivando los macrófagos.
VM202	VM Bipharma	Es un plásmido con información para producir el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que mejora la supervivencia y crecimiento de las células nerviosas
Reldesemtiv	Cytokinetics	Es un activador de troponina, que actúa en su unión con el calcio. De esta manera aumenta la contractividad muscular.
Masitinib	AB Science	Inactiva proteínas tirosin cinasas en el sistema inmune, disminuyendo la inflamación.
NurOwn	BrainStorm Cell Therapeutics	Células madre mesenquimales obtenidas de pacientes que se modifican para promover el crecimiento nervioso y supervivencia.
NSI-566	Neuralstem	Terapia con células madre derivadas de médula espinal, destinadas a nutrir, proteger y reparar las neuronas motoras de los pacientes.
CNS10-NPC-GDNF	Cedars-Sinai	Células neurales progenitoras genéticamente modificadas para producir un factor de crecimiento llamado GDNF (factor neurotrófico derivado de glía).
Mexiletine		Destinado a tratar los calambres musculares, inhibiendo canales de sodio y disminuyendo la conducción del impulso nervioso.

Recientemente, se está investigando con el uso de células madre para el tratamiento de la ELA. La terapia celular consiste en el tratamiento con medicamentos basados en células de origen humano (autogénico: del propio paciente, o alogénico: de un donante) o de origen no humano (xenogénico). Las células administradas pueden sustituir a las células enfermas o dañadas del paciente y, por otro lado, la liberación de factores tróficos por parte de estas nuevas células tiene el potencial de tratar la patología. Como inconveniente, tenemos la posibilidad de rechazo (minimizada con el uso de células autólogas), y la propensión a causar tumores debido a su origen pluripotencial. Los factores neurotróficos han demostrado aumentar la supervivencia de neuronas motoras en ELA (Petrou et al., 2016) y en modelos animales de enfermedades degenerativas (Chen et al., 2015). Estudios en animales muestran que el trasplante con células madre mesenquimales (CMM) para el tratamiento de la ELA no alteran los niveles de citocinas, y fueron bien toleradas en ratones (Thomsen et al., 2014). Los ensayos clínicos sobre el trasplante de células madre en pacientes con ELA se encuentran aún en Fase I y II de ensayos clínicos, y concluyeron que los trasplantes se pueden realizar de manera segura incluso a altas tasas de administración (Glass et al., 2016, Petrou et al., 2016, Oh et al., 2018).

1.5. Modelos para el estudio preclínico de la ELA

Para el estudio de la ELA se utilizan muestras de pacientes que permiten buscar biomarcadores (LCR, sangre u orina) y estudiar alteraciones de sistemas específicos (biopsias o células circulantes). Pero para facilitar su estudio, se han desarrollado modelos que van desde los más simples (sistemas bioquímicos *in vitro*) a sistemas cada vez más complejos, como cultivos celulares, cultivos tisulares organotípicos y modelos animales. Gracias a la secuenciación genómica de los pacientes de ELA, en los últimos años se ha avanzado en el desarrollo de estos modelos, pues mediante biología molecular se han incorporado las mutaciones encontradas en los pacientes. De esta manera, se ha hecho un gran avance en el estudio de la fisiopatología del ELA pues esas técnicas han contribuido a la validación de nuevas dianas terapéuticas sobre las que desarrollar estudios preclínicos en la búsqueda de un tratamiento eficaz. Recientemente se han iniciado estudios con células madre derivadas de pacientes (Matus et al., 2014). Las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) poseen propiedades únicas tales como la autorrenovación y la diferenciación en múltiples subtipos celulares como las neuronas motoras. Estas neuronas motoras generadas de las iPSCs derivadas de fibroblastos de piel de pacientes, con las formas esporádica o familiar de ELA, han supuesto una técnica innovadora como modelo de enfermedad. Estas células poseen el gen endógeno mutado en un fondo genético

individualizado del paciente, además de superar las desventajas de realizar la sobreexpresión de la mutación en los otros modelos. Mediante la técnica de edición génica CRISPR/Cas9, se puede corregir la mutación en estas líneas celulares y comparar la línea derivada del paciente con la corregida. Por otra parte, un reciente trabajo ha demostrado que los oligodendrocitos derivados de pacientes con ELA familiar y esporádica, juegan un papel importante en la toxicidad de la motoneurona mediante la liberación de factores solubles tóxicos y por contacto celular (Ferraiuolo et al., 2016).

Cada uno de estos modelos tiene sus ventajas y sus inconvenientes (para una revisión profunda, ver (Van Damme et al., 2017)), pero son los modelos animales murinos portadores de las mutaciones descubiertas en la ELA los que mejor mimetizan la patología del ser humano. No obstante, hay que tener en cuenta que, en un mismo modelo, existe mucha variabilidad en los resultados en función del promotor, del número de copias que se introducen del gen mutado, del fondo genético del ratón o del sexo del animal. Por lo tanto, sigue siendo muy difícil trasladar los resultados en animales a la clínica; prueba de ello son los grandes avances conseguidos en estos modelos y la escasa repercusión que encontramos en forma de tratamientos disponibles. A continuación, se describen los modelos más relevantes que resumen la mayoría de los casos de ELAf:

Modelos SOD1: SOD1 fue el primer gen mutado identificado causante de ELAf, y codifica la síntesis de la enzima citosólica superóxido dismutasa 1, la cual desempeña su función controlando el equilibrio reducción-oxidación celular. El primer modelo transgénico fue el portador de la mutación G93A (Gurney et al., 1994, Ripps et al., 1995), el cual sigue siendo el más utilizado a día de hoy. Se han desarrollado más de 20 modelos de ratones distintos siguiendo las mutaciones en la enzima SOD1 descritas en pacientes, como por ejemplo el G37R, el G85R, el G86R o el D83G. Estos ratones transgénicos expresan altos niveles de la proteína mutada, bajo el promotor endógeno, y si bien presentan variaciones en el desarrollo y transcurso de la enfermedad, todos terminan presentando pérdida de motoneuronas, déficit en el transporte axonal, agregación proteica, parálisis progresiva y reducida esperanza de vida (Philips and Rothstein, 2015). Se ha demostrado que sobreexpresando la enzima SOD1 fisiológica humana se acelera la patología en el ratón SOD1^{G93A}, e incluso se desarrolla la enfermedad en el modelo control no enfermo SOD1-A4V al alcanzar un umbral mínimo de sobreexpresión (Lutz, 2018). Esta observación de daño motoneuronal asociado a la sobreexpresión de la enzima fisiológica, puede ser de interés para comprender la patogenia de los casos de ELA esporádica (Graffmo et al., 2013). Los ratones

knockout (KO) para SOD1, presentan estrés oxidativo crónico, menor esperanza de vida y alteraciones motoras; sin embargo, no muestran pérdida de neuronas motoras. Todos estos datos apoyan la hipótesis de que lo que parece que está detrás de este modelo de ELA es una ganancia de función tóxica (Gurney et al., 1994) y no una pérdida de su función.

Modelos TDP-43: La proteína TAR de unión a ADN (TDP-43) fue importante en la asociación de la ELA con la DFT (Mackenzie, 2007). La proteína, que se encuentra fisiológicamente en el núcleo, sale y se agrega en el citosol. Se trata de una característica en muchas formas de ELA, pero se desconoce si la mortalidad la produce su salida del núcleo o la agregación citoplasmática posterior. Las mutaciones en este gen se presentan en un 4 % de las formas familiares. La gran variabilidad de modelos desarrollados ha ayudado a investigar la función de esta mutación, pero no permite establecer una conclusión general por la falta de homogeneidad en los resultados.

Modelos FUS: Desde que se descubrió la asociación de mutaciones en FUS en la ELA (Kwiatkowsky, 2009; Vance, 2009), se han desarrollado hasta 12 modelos de ratón transgénicos, tanto KO como de sobreexpresión. Se cree que bajo estrés celular, FUS se transporta al citoplasma donde crea gránulos que se eliminan en condiciones normales, pero que se acumulan cuando existe la mutación. La pérdida de FUS no genera fenotipo ELA, mientras que la mutación parece que le otorga una ganancia de función. Cabe destacar que la sobreexpresión del gen FUS humano sin mutaciones, también provoca alta toxicidad en los ratones con disfunción motora.

Modelos C9orf72: En 2011 se identificó que la repetición del hexanucleótido GGGGCC en el primer intrón del gen C9orf74 aparecía en un 40 % de los casos de ELAf, y también en casos de DFT (DeJesus-Hernandez et al., 2011, Renton et al., 2011). Curiosamente, esta expansión puede estar detrás de formas de ELA, de DFT, de ambas patologías juntas o de casos que no desarrollan la enfermedad. Además, el número de repeticiones parece estar relacionado con la gravedad (van Blitterswijk et al., 2013). Actualmente hay tres hipótesis detrás del mecanismo que causa la enfermedad: (i) pérdida de función debido a una regulación a la baja por la expansión; (ii) alteración del procesado normal de ARN celular; y (iii) acumulación de la proteína aberrante.

Modelos PFN1: Las mutaciones en PFN1 relacionadas con la ELA fueron identificadas en 2012 (Wu et al., 2012) y afectan a un 2% de ELAf. Se conoce que el gen está relacionado con

la regulación del citoesqueleto (formación de filamentos de actina), pero se desconoce su relación con la ELA. Dada su relación con el ensamblaje de microtúbulos, la pérdida completa de función es incompatible con el desarrollo del ratón.

Modelos UBQLN2: Las mutaciones en este gen están descritas como causantes de ELA, DFT o ambas patologías. Se cree que la mutación altera el aclaramiento proteico mediado por el sistema ubiquitín-proteasoma, generando una agregación tóxica de proteínas.

De la heterogeneidad de modelos como de la variabilidad en los fenotipos que producen, se concluye que estos aspectos dificultan el diseño de los ensayos clínicos, lo que ha podido conducir a resultados no satisfactorios al tratar cohortes incorrectamente. Esto, unido al hecho de que en los modelos podemos iniciar el tratamiento antes de la aparición de los síntomas, puede ser una de las explicaciones del fracaso en el desarrollo clínico de fármacos para tratar la ELA.

2. RATÓN SOD1^{G93A}

El modelo de ELA utilizado en esta Tesis Doctoral para el estudio mitocondrial es el ratón SOD1^{G93A}. Se trata de un ratón transgénico que porta de manera hemizigota el gen humano SOD1 con una mutación en su codón 93 (cambio de un aminoácido de alanina por uno de glicina) bajo el control del promotor endógeno. Por lo tanto, se trata de un modelo animal de ELA^f que sobreexpresa la proteína superóxido dismutasa 1 humana mutada (hSOD1^{G93A}). Fue desarrollado por Mark E. Gurney y colaboradores en 1994, poco tiempo después del descubrimiento de que esta mutación estaba detrás de hasta un 20 % de los casos de ELA^f (Rosen et al., 1993). El ratón desarrollado tenía un fondo genético B6SJL, pero el ratón más ampliamente utilizado es su línea congénita de fondo C57BL/6J, con una esperanza de vida ligeramente superior (supervivencia 50 % de 157 ± 9 días). Actualmente, sigue siendo el modelo de estudio de ELA más utilizado, pues mimetiza en gran medida la patología en humanos (Turner and Talbot, 2008). Estos ratones desarrollan una progresiva disfunción motoneuronal, con parálisis total y muerte a los 4-5 meses. La **Figura 2**, muestra el curso temporal de las alteraciones que desarrolla el ratón a nivel molecular, celular y clínica, definiendo el fenotipo presintomático y sintomático. El número de copias que sobreexpresa la mutación está directamente relacionado con la progresión de la enfermedad, siendo el modelo que se ha utilizado en esta Tesis el que expresa un alto número de copias.

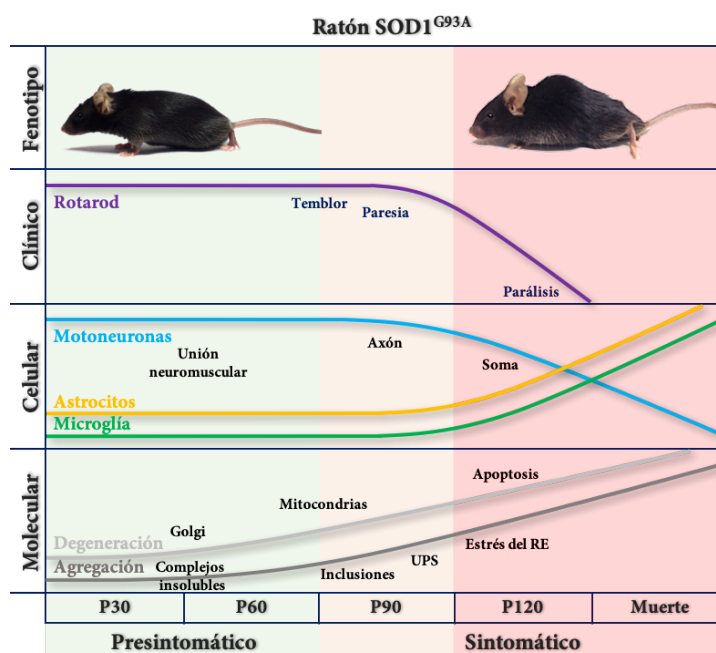


Figura 2. Evolución temporal de los eventos clínicos y neuropatológicos en el ratón SOD1^{G93A}. Figura modificada de Turner and Talbot, 2008.

Durante más de 25 años el ratón SOD1^{G93A} ha servido para esclarecer la fisiopatología de la ELA, y en él se han probado numerosas moléculas dirigidas a las dianas que han sido propuestas para tratar la ELA, caso del riluzol. También es el modelo estándar para los estudios preclínicos de eficacia (Zoccolella et al., 2009). A pesar de los avances, los mecanismos exactos por los que produce la ELA se desconocen y la traslación de los resultados del ratón a la clínica no ha sido muy satisfactoria.

3. PROTEÍNA SOD1 HUMANA

Se trata de una enzima citosólica de 154 aminoácidos (15,9 KDa) que posee como cofactor un átomo de zinc (Zn) y otro de cobre (Cu). Fue descubierta por McCord y Fridovich en 1969 en eritrocitos, pero mantiene una expresión ubicua y elevada (cerca del 1% del total de proteínas celulares). Fisiológicamente se presenta en forma de homodímeros (32 KDa) que catalizan una reacción clave en el mecanismo antioxidante de la célula (**Figura 3**): reacciona con el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2). El H_2O_2 , sigue otras rutas para su eliminación ya que sigue presentando una amenaza celular como especie altamente oxidante, metabolizándose vía catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa (GPx) a agua y oxígeno (**Figura 4**). En el humano, la familia de las enzimas SOD está formada además por la SOD2 mitocondrial (que tiene manganeso como

cofactor) y la SOD3 localizada en el líquido extracelular, ambas estructuradas en homotetrámeros. La SOD1, pese a ser mayormente citosólica, también mantiene cierta localización mitocondrial (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001, Sturtz et al., 2001, Vijayvergiya et al., 2005), en el núcleo y lisosomas (Crapo et al., 1992), y en el retículo endoplásmico (Kikuchi et al., 2006).

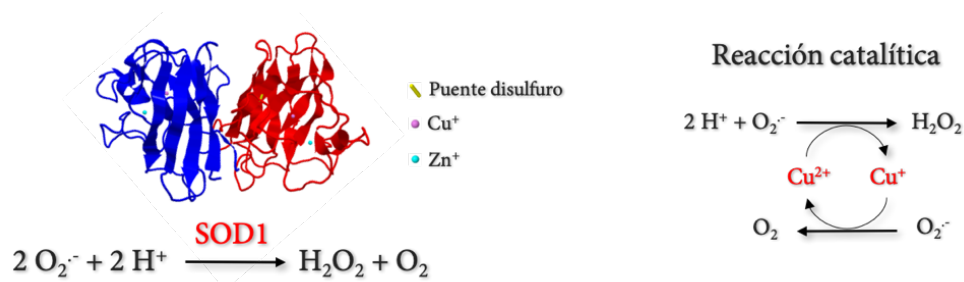


Figura 3. Estructura de la enzima humana SOD1 dimerizada en solución, modelada en jSmol a partir de la estructura 1L3N de RCS Protein Databank (DOI: 10.2210/pdb1L3N/pdb) obtenida por resonancia magnética nuclear (RMN) en disolución (Banci et al., 2002). Se puede observar cada uno de los monómeros de SOD1 (azul y rojo), el puente disulfuro (en amarillo), y los iones de cobre (magenta) y zinc (cian). Debajo de la estructura de la proteína se muestra la reacción global de conversión del radical superóxido en H_2O_2 , y a la derecha se desarrolla la reacción catalítica con del ciclo oxidación-reducción del átomo de cobre.

En su estructura cuaternaria destaca un lazo electrostático que guía al ion superóxido al sitio activo reductor del ion Cu^{2+} , y un lazo de unión a Zn^{2+} . Las dos subunidades poseen un puente disulfuro interno (entre la cisteína 57 y la 146). Tanto este enlace como la unión del cobre los lleva a cabo la chaperona citosólica portadora de cobre (CCS, chaperona de cobre para SOD1). La pérdida de los iones metálicos o del puente disulfuro interno alteran drásticamente la proteína e inducen una elevada toxicidad, pues el ion Cu^{2+} es altamente reactivo y de ahí la importancia de incluirlo en esta enzima.

Además del clásico papel como antioxidante celular directo, se ha descrito una nueva función de la enzima como factor de transcripción. En presencia de elevadas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) se transloca al núcleo y regula la expresión de genes antioxidantes y de otros implicados en la reparación génica (Tsang et al., 2014). Por otro lado, el propio producto de la reacción que cataliza, el H_2O_2 , puede modular señales como la expresión génica, proliferación celular, diferenciación y muerte celular. Por lo tanto, la enzima SOD1 es un importante controlador de la función y señalización celular.

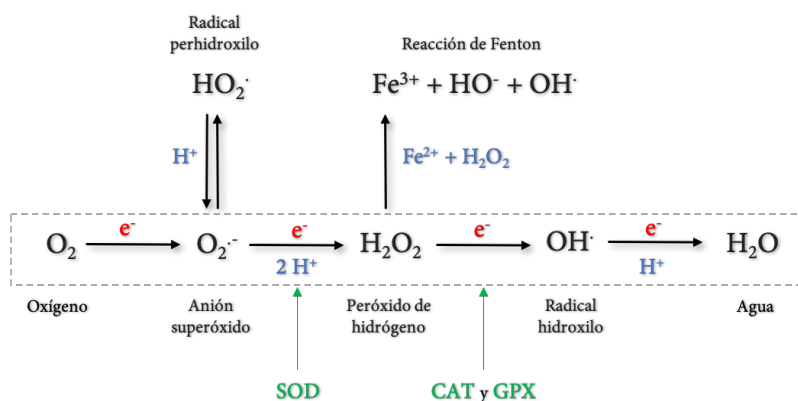


Figura 4. Química de las especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas a partir de una reducción secuencial del oxígeno molecular. También se muestran dos rutas alternativas para la generación de ROS, como son la reacción de Fenton y la formación del radical perhidroxilo, así como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en las reacciones que catalizan.

4. CONSECUENCIAS DE LA MUTACIÓN SOD1^{G93A}

La mutación G93A altera la proteína SOD1 a nivel de su estructura terciaria, le aporta mayor hidrofobicidad y también mayor dinamismo (Shipp et al., 2003). Los mecanismos por los que produce la ELA todavía no se conocen bien, pero las hipótesis más aceptadas se encaminan hacia una ganancia de función tóxica más que a un aumento o cese de su actividad fisiológica. Esta ganancia de función se divide en dos vías principales: la alteración funcional relacionada con un desequilibrio redox celular, y la alteración estructural relacionada con la agregación proteica (**Figura 5**). En cuanto a las alteraciones en la homeostasia redox, la SOD1 mutada podría catalizar reacciones de peroxidación así como la nitración de residuos de tirosina. También podría realizar la catálisis inversa (del oxígeno a anión superóxido), y la alteración de su estructura podría suponer la pérdida de los iones de Zn^{2+} y Cu^{2+} que alberga en su interior, lo que generará ROS a través de reacciones de Fenton (Pasinelli and Brown, 2006).

Por su parte, la alteración estructural favorece la agregación de la proteína tanto consigo misma, como con otras proteínas (de las que hay descritas más de 350 interacciones), generando agregados insolubles e impidiendo su correcta función. Un ejemplo de proteínas con las que presenta una alta interacción son las de choque térmico (Shinder et al., 2001) o la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Pasinelli et al., 2004). Estas interacciones también se observan en organelas como la mitocondria, el aparato de Golgi o retículo endoplásmico, así como en el sistema ubiquitín-proteasoma (UPS) de degradación y reciclado de proteínas. Además, conlleva a una alteración global de las chaperonas celulares. Los agregados proteicos se

acumulan en filamentos intermedios y pueden alterar a su vez el transporte axonal (Boillee et al., 2006). La mutación G93A también se ha relacionado directamente con la activación de caspasas, iniciando las vías apoptóticas y de neuroinflamación (Pasinelli et al., 2000, Guegan et al., 2001).

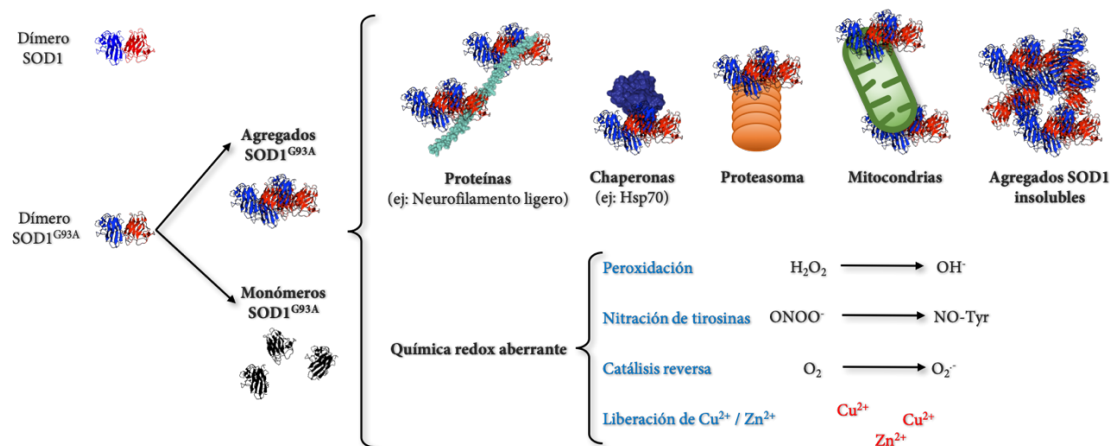


Figura 5. Vías de toxicidad celular propuestas para la mutación SOD1^{G93A}. El esquema muestra las vías tóxicas asociadas tanto a la agregación de la proteína como las reacciones químicas anómalas que puede llevar a cabo. Figura modificada de Boillee et al., 2006 y de Pasinelli and Brown, 2006.

La oxidación de la forma nativa de la enzima podría provocar cambios estructurales similares a los que se producen con las mutaciones detectadas en los casos de ELAf, pues dejan libre el mismo epítipo. El anticuerpo C4F6, es un anticuerpo monoclonal específico de varias conformaciones patológicas de la enzima. Entre estas conformaciones, también es capaz de reconocer una forma oxidada de la proteína fisiológica SOD1 (Rotunno et al., 2014). Por lo tanto, se cree que en estos casos, la enzima nativa oxidada puede estar detrás de la ELA esporádica tal y como lo está la mutada en la ELAf (Ezzi et al., 2007, Bosco et al., 2010, Chen et al., 2012, Guareschi et al., 2012, Rotunno and Bosco, 2013).

En la presente Tesis Doctoral exploraremos las bases fisiopatológicas y bioquímicas en las que participa la proteína SOD1 en este modelo de ratón SOD1^{G93A}, centrándonos en los efectos que tiene sobre la estructura y función de la mitocondria. Por ello, es pertinente abordar el conocimiento actual acerca de esta organela.

5. LA MITOCONDRIA

La mitocondria es un orgánulo de la célula eucariota, que surgió por la simbiosis entre una proteobacteria y una célula mayor, hace alrededor de 1500 millones de años (Teoría Endosimbiótica de Lynn Margulis, 1967). Se trata de una organela con su propio ADN, ARN

y ribosomas 70s y capacidad de dividirse. Comúnmente se le atribuye el papel de “maquinaria energética de la célula” debido a su función en la transformación de energía a ATP, pero cuenta con gran versatilidad de funciones celulares como la susodicha función energética, la metabólica, la de señalización o la de apoptosis (McBride et al., 2006). Además, existe una gran variedad en las mitocondrias en función del tipo celular, pues su proteoma varía un 20-30 % entre dos tejidos distintos, demostrando una alta especialización metabólica y de señalización (Mannella et al., 2013).

Las mitocondrias forman una red móvil muy dinámica e interconectada, que sufre procesos de fusión y fisión mitocondrial finamente controlados en función de las señales celulares y la demanda de energía (Palmer et al., 2011). Está formada por dos membranas que conforman cuatro compartimentos diferenciados: la membrana mitocondrial externa (MME), la membrana mitocondrial interna (MMI) que a su vez forma las crestas, el espacio intermembrana (EI) y la matriz. Sus membranas albergan importantes proteínas para el transporte (de proteínas, iones o metabolitos), para el metabolismo y para controlar su morfología.

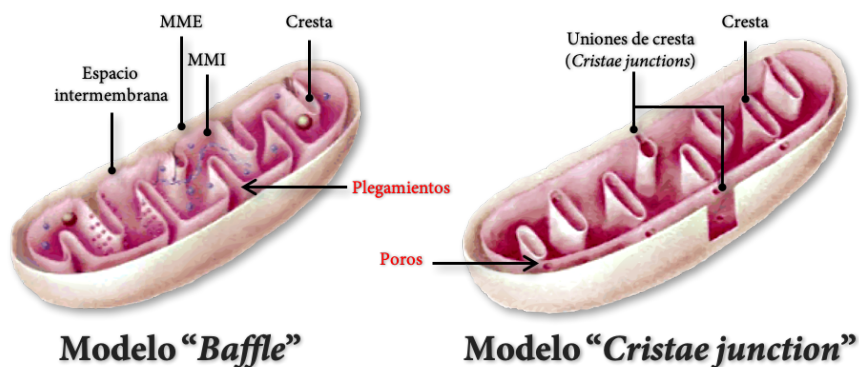


Figura 6. Modelos de estructura mitocondrial en función de la formación de las crestas a partir de la MMI. El modelo “Baffle” define las crestas como meros plegamientos de la MMI para aumentar su superficie, mientras que el modelo “Cristae junction” (uniones de cresta) contempla una dinámica controlada de las crestas a través de su zona de unión con la MMI en la que forma un poro. Figura modificada de (Perkins and Frey, 2000).

La **membrana mitocondrial externa (MME)** está compuesta por lípidos similares a los de la membrana nuclear, siendo rica en fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol (Horvath and Daum, 2013). Se trata de una barrera que controla la difusión de pequeñas moléculas (iones, nucleótidos y metabolitos) a través de porinas como el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Cogliati et al., 2016), y de proteínas como la

translocasa de la membrana mitocondrial externa, TOM. También protege a la célula de productos tóxicos mitocondriales (Pernas and Scorrano, 2016), y alberga proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial (Mfn1 y Fis1) y la apoptosis (BAK) (Cogliati et al., 2016). La MME interacciona con otras organelas como el retículo endoplásmico en las llamadas membranas de asociación mitocondrial (MAMs), con otras mitocondrias, con el núcleo o con el citoesqueleto (Cogliati et al., 2016, Pernas and Scorrano, 2016).

La **membrana mitocondrial interna (MMI)** contiene una alta concentración de cardiolipina, pues al ser un fosfolípido muy insaturado, le aporta la hidrofobicidad que necesita para evitar el paso de iones, pero evita la rigidez que le daría el colesterol. Es mucho más impermeable que la MME, lo que le permite generar un gradiente de iones estable. Se mantiene estrechamente ligada en algunos puntos a la MME gracias a complejos proteicos, como la traslocasa de membrana interna (TIM), que permite importar las proteínas del citosol a la matriz mitocondrial o por complejos que permiten intercambiar lípidos entre las dos membranas mitocondriales, por complejos encargados del ensamblaje de proteínas, o por el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) (Pernas and Scorrano, 2016). Posee mayor superficie que la MME, por lo que se pliega formando unas estructuras tubulares denominadas crestas.

En las **crestas** se concentran proteínas como las de la cadena de transporte electrónico (CTE) y la F_1F_0 -ATP sintasa con las que se realiza la fosforilación oxidativa (o respiración mitocondrial). La idea de que las crestas se forman como un plegamiento debido a una mayor superficie frente a la MME (modelo de mitocondria “*baffle*”, (Palade, 1952, Palade, 1953), ha sido reemplazado por un modelo denominado “*cristae junction*” (**Figura 6**) (Daems and Wisse, 1966) en el que las crestas se forman por invaginaciones finamente controladas, que presentan gran variedad de forma, tamaño y número (dinamismo), siendo las más habituales las largas y tubulares o lamelares. Este modelo define que las crestas se encuentran unidas a la MMI por un cuello estrecho formando un poro, que inicialmente se llamó *pediculi cristae* (pie de cresta) (Daems and Wisse, 1966) y posteriormente *cristae junction* (unions de cresta) (Perkins and Frey, 2000) (**Figura 7**).

Las uniones de cresta son elementos ubicuos, cuyo tamaño en mitocondrias neuronales es alrededor de 28 nm (Perkins et al., 1997), y en la mitocondria de hígado de rata es entre 20 y 50 nm (Mannella et al., 1994, Mannella et al., 1997, Mannella et al., 2001). Su formación viene

delimitada por una serie de lípidos y proteínas reguladoras, mientras que su función principal es la de restringir la difusión de los elementos de la cresta (iones, metabolitos o proteínas) a la MMI o al espacio intermembrana (Mannella et al., 1997), manteniendo una asimetría entre estas dos estructuras. En el interior de las crestas se produce un gradiente de protones, de sustratos (ADP, ATP), iones fosfato, calcio y sodio, que debe ser finamente controlado para la correcta función mitocondrial, y donde la dinámica de las crestas y del propio pie de cresta es determinante.

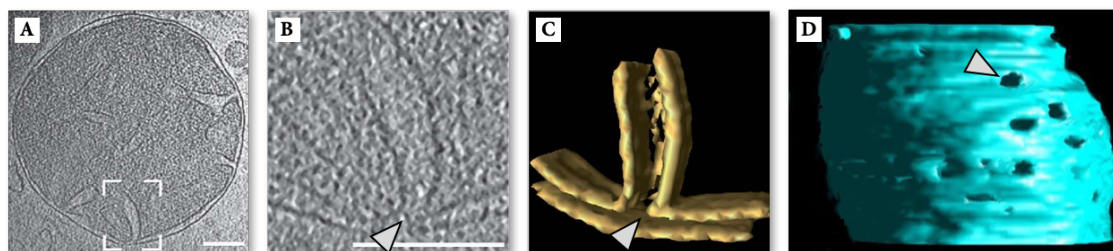


Figura 7. Imagen de una mitocondria de levadura *Saccharomyces cerevisiae* realizada mediante tomografía crioelectrónica (A), y ampliación de una unión de cresta (B). En C se puede observar la reconstrucción tridimensional de la unión de cresta (señalada por la flecha) mostrando la MME y la invaginación de la MMI. La imagen D muestra los poros de la MMI que se forman en las zonas de unión de crestas. Imagen modificada de (Zick et al., 2009, Perkins et al., 2010).

El **espacio intermembrana (EI)** posee una composición similar al citoplasma debida a la gran permeabilidad que presenta las MME. Se interrumpe en zonas de unión entre la MMI y la MME donde abundan los complejos proteicos relacionados con la dinámica mitocondrial y las translocasas de transporte de proteínas (Reichert and Neupert, 2002).

La **matriz** es el lugar donde se encuentran el ADN mitocondrial (ADNm), los ribosomas, los metabolitos y los enzimas del metabolismo, y en ella se producen las reacciones metabólicas, como el ciclo de Krebs y la β -oxidación de ácidos grasos. El ADNm humano es circular y cuenta con 37 genes que codifican 13 proteínas, 2 ARN ribosómicos (ARNr) y 22 ARN de transferencia (ARNt), aunque parte de las proteínas mitocondriales se codifican en el ADN nuclear.

5.1. La dinámica y la arquitectura mitocondrial

La naturaleza lipídica de la mitocondria le permite sufrir procesos de fusión y fisión de sus membranas, originando morfologías diversas, con gran dinamismo, que vienen determinadas por el tipo celular y sus necesidades específicas. De esta manera, consigue adaptarse de manera eficiente para el desarrollo de sus funciones, y también le permite compartimentalizar los procesos que desempeña. Podemos encontrar mitocondrias con

distintos tamaños (0,5/1 μm), forma variable (redonda/alargada/ramificada), móviles o inmóviles y de distinta estructura y composición interna. Este dinamismo conforma la “arquitectura mitocondrial” de cada tipo de célula, y están orquestadas generalmente por largas proteínas GTPasas de la familia de la dinamina. La dinámica mitocondrial conlleva desde su proceso de formación (biogénesis), la fusión, la fisión, la movilidad, hasta su eliminación (mitofagia), como se puede ver en la **Figura 8**:

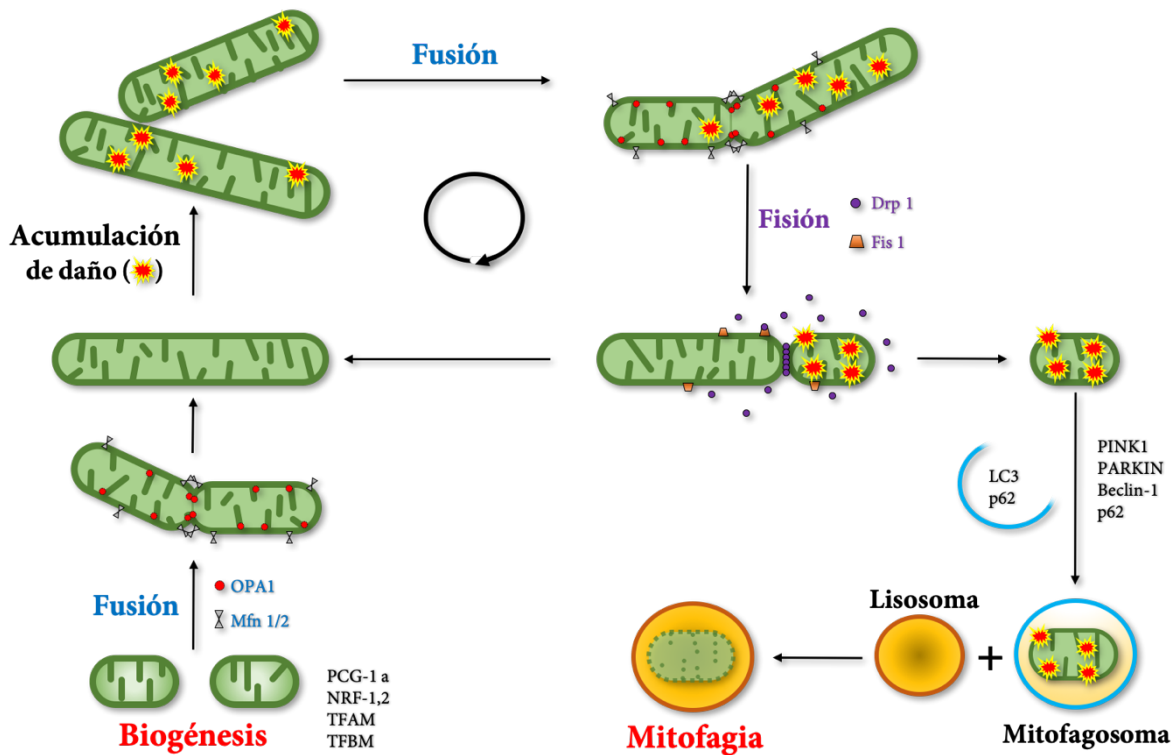


Figura 8. Ciclo de la mitocondria desde su formación (biogénesis) hasta la eliminación (mitofagia), con las principales proteínas implicadas en cada proceso. Figura modificada de (Kluge et al., 2013).

a) **Biogénesis:** las mitocondrias no se sintetizan *de novo*, si no que surgen del crecimiento y división de las preexistentes. Este proceso se consigue sintetizando e incorporando material estructural nuevo (lípidos y proteínas), duplicando el ADNm y fisionando la mitocondria, lo que requiere también participación y coordinación del ADN nuclear. El proceso se desencadena en respuesta a las necesidades celulares, frente a estímulos como el estrés, el ejercicio, la exposición al frío, la restricción calórica, el estrés oxidativo, la hipoxia o la división celular. Como regulador maestro de este proceso se ha descrito al factor de transcripción coactivador 1 α de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PGC1 α), mientras que para la transcripción y replicación del ADNm se requiere el factor de transcripción mitocondrial A (Tfam) (Ventura-Clapier et al., 2008). Se calculó que

el tiempo de vida media en el cerebro de una mitocondria es de 24,4 días en cerebro (Menzies and Gold, 1971), siendo menor en el corazón (17,5 días) o en el hígado (9,3 días).

b) Fusión: es el proceso principal para intercambiar ADN_m, metabolitos, lípidos o proteínas generando una población mitocondrial homogénea (si se fusionan dos células con distinto ADN_m, se forma una red homogénea de mitocondrias en 8h). La fusión en largas cadenas es síntoma de salud mitocondrial, pues se generan mitocondrias más eficientes en sus procesos. Además se cree que es importante para mantener la herencia y evitar patologías asociadas a sus mutaciones (Westermann, 2002). No obstante, en momentos de estrés celular las mitocondrias se hiper-fusionan para intentar superar el daño, pudiendo ser este paso transitorio y previo al inicio de la fragmentación y apoptosis. La fusión está orquestada por las proteínas mitofusina 1 y 2 (Mfn 1 y 2) localizadas en la MME (Ishihara et al., 2004), y por la proteína de atrofia óptica (OPA1), localizada en la MMI (Olichon et al., 2002, Chan, 2006a). En el proceso se aproximan dos mitocondrias y en la zona de contacto oligomerizan las proteínas Mfn 1 y 2, provocando la fusión de la MME. OPA1 se encarga luego de la fusión de las membranas internas (**Figura 8**).

c) Fisión: mediante la fisión, una mitocondria genera dos mitocondrias. Es un proceso básico para la biogénesis, pero también es importante para escindir partes dañadas de la mitocondria y eliminarlas por la vía lisosomal (mitofagia), evitando que el daño se propague al resto de la mitocondria. Está dirigido por la proteína citosólica Drp 1 y la proteína Fis 1, anclada a la MME (Smirnova et al., 2001, Suzuki et al., 2003, Chan, 2006a). Además, en este proceso intervienen tanto el citoesqueleto como el retículo endoplásmico. Se realiza en tres pasos: primero el RE marca el sitio de fisión y junto a Fis1 recluta la proteína Drp 1, que oligomeriza formando un anillo y finalmente escinde las membranas hidrolizando GTP (**Figura 8**) (Pernas and Scorrano, 2016). También intervienen otras proteínas mitocondriales como el factor de fisión mitocondrial (FFM) y la proteína de dinámica mitocondrial MiD51. Por lo tanto, aunque Drp 1 se presente como la proteína clave del proceso, el ratón Drp 1^{-/-} también sufre fisión mitocondrial, lo que sugiere la presencia de otros reguladores. La estructura formada por la unión RE-mitocondria (ERMES del inglés *ER mitochondrial encounter structures*) también ayuda a copiar el ADN_m dividiendo los nucleoides hacia cada una de las mitocondrias.

d) Movilidad: Se estima que el 33 % de las mitocondrias se mueven para dirigirse allá donde sean más necesarias, mientras que las mitocondrias restantes están inmóviles proporcionando energía local. El movimiento es estimulado por calcio y facilitado por la fisión mitocondrial: en neuronas tratadas con tetrodotoxina (un bloqueante de los canales de sodio que evita su despolarización), las mitocondrias tienden a fusionarse, mientras que en las tratadas con un estímulo despolarizante de potasio, tienden a fisionarse. Los movimientos más llamativos se realizan en las neuronas, donde viajan del soma al axón, como de la terminación nerviosa presináptica y viceversa. En la motoneurona este movimiento puede suponer una distancia de más de un metro. Los viajes a larga distancia (tanto anterógrados como retrógrados) están mediados por microtúbulos, a una velocidad media de 0,6 $\mu\text{m/s}$ mientras que los de corta distancia, así como su fijación en una localización específica, lo median los filamentos de actina a velocidades de 0,2 $\mu\text{m/s}$ (Morris and Hollenbeck, 1995, Ligon and Steward, 2000).

e) Mitofagia: Sirve para eliminar las mitocondrias dañadas y controlar el volumen de las mitocondrias de la célula. Se han descrito varios mediadores, como la propia cardiolipina (Chu et al., 2013), pero el mejor estudiado es la vía PINK1/Parkina. PINK es una secuencia dirigida a mitocondria que se importa a la MMI por la translocasa TOM, y allí se escinde por la proteína PARL y se degrada en el proteasoma. La mitocondria dañada se escinde, pierde su potencial de membrana mitocondrial, se inhibe este proceso y PINK1 se acumula en la MME reclutando la ligasa de ubiquitina Parkina, que ubiquitina proteínas como el VDAC, Mfn 1 y 2, TOM o Fis1 (Jin and Youle, 2012). Las proteínas ubiquitinadas interactúan con LC3-II en el autofagosoma y dirigen la mitocondria para su destrucción en el lisosoma (**Figura 8**).

5.2. Dinámica y arquitectura de la membrana mitocondrial interna/crestas

Del mismo modo que existe un dinamismo de las mitocondrias que condiciona su funcionalidad, existe un dinamismo en la MMI y las crestas que adoptan una gran variedad de morfologías relacionadas con una función determinada como la metabólica, la bioenergética, la apoptosis o el estrés oxidativo. En 1966, Hackenbrock definió dos estados morfológicos de la mitocondria según la expansión o contracción de la matriz y de las crestas (ortodoxo y condensado), que estaba regulado en función de la demanda energética (Hackenbrock, 1966). Las mitocondrias en estado condensado son observables cuando existe un exceso de sustrato,

y representan un estado de alta actividad. Su morfología se caracteriza por una matriz comprimida en un pequeño volumen, y con crestas fusionadas en elementos de mayor tamaño, interconectadas, en formas tubulares, y con varios elementos de unión a la MMI. A medida que desciende la concentración de ADP, la mitocondria fisiona sus crestas en otras más pequeñas, con forma tubular o cortas y planas (lamelares), con tan solo una o dos zonas de unión a la MMI. También se expande la matriz y adquiere un estado ortodoxo, metabólicamente menos activo (**Figura 9**). Esta organización de las crestas mitocondriales como mecanismo de regulación bionérgica, define la quimiosmosis como un proceso localizado y cinéticamente controlado (Williams, 2000, Tedeschi, 2005), a diferencia de la teoría quimiosmótica original de Mitchell (Mitchell, 1979) que lo presentaba como un proceso deslocalizado.

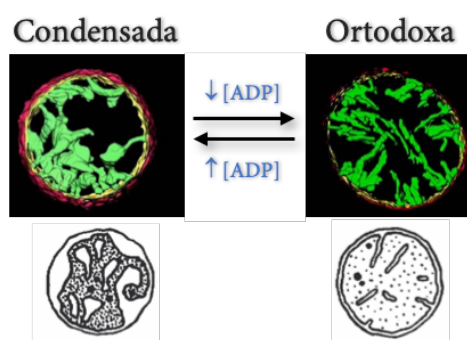


Figura 9. Cambios en la topología de cresas debido al cambio en la concentración de sustratos, asociados a la transición entre los estados condensado y ortodoxo. Las imágenes superiores fueron obtenidas mediante tomografía crioelectrónica en mitocondrias en ambos estados, donde se observa la membrana externa en rojo, la interna en amarillo y las crestas en verde (modificado de Manella, 2006). Debajo de cada imagen, se muestra la representación original realizada por Charles R. Hackenbrock en 1966.

En relación a la apoptosis, cuando se inicia este tipo de muerte celular se produce una curvatura de las crestas, su fusión, el ensanchamiento de las uniones de cresta y la consiguiente liberación de citocromo C que activará las caspasas citoplasmáticas (Scorrano et al., 2002) (Sun et al., 2007). Otro ejemplo de la relación de la dinámica de crestas con una función celular, es el cambio de forma que se produce en las mitocondrias de amebas (de tubular a cúbica), coincidiendo con un aumento de los radicales libres. Esta morfología también se ha visto en otros modelos de estrés oxidativo y se especula con que obedezca a un mecanismo de defensa (Mannella, 2006).

5.3. Determinantes moleculares de la topología de la MMI y crestas

La forma de una membrana puede ser compleja debido a su curvatura, a procesos de fusión y fisión o a su unión a otros elementos (proteínas, citoesqueleto o incluso otras

membranas). En el caso de la MMI, su unión con la MME es un factor clave para definir su forma; además un volumen constante de MME es imprescindible para que se produzcan las invaginaciones. La morfología de la MMI está regulada por: la cardiolipina, un lípido estructural de la mitocondria y al que se anclan numerosas de estas proteínas reguladoras; el translocador de nucleótidos (ANT); el complejo F_1F_0 -ATP sintasa; las proteínas mitofilinas (John et al., 2005); y la proteína OPA1 (Frezza et al., 2006).

EL complejo F_1F_0 -ATP sintasa provoca una deformación definida de la membrana (Dudkina et al., 2005, Minauro-Sanmiguel et al., 2005). Inicialmente se comprobó que su dimerización y oligomerización está implicada en la curvatura de la MMI ya que la inhibición de su dimerización produce crestas con formas multilamelares (Paumard et al., 2002), y las mutaciones en el gen de una de sus subunidades produce crestas redondas (Celotto et al., 2006). Esta deformación de la membrana, hace que su localización mayoritaria sea en el borde extremo de la cresta o en la zona de unión de cresta (Strauss et al., 2008, Davies et al., 2012).

Las proteínas mitofilinas componen el sistema de contacto y organización mitocondrial (MICOS). Se trata de un complejo multiproteico situado en la zona de la MMI que forma las uniones de cresta, y que es crucial para la formación y el mantenimiento de las crestas (John et al., 2005). La existencia de un complejo proteico que contenía mitofilina en la mitocondria humana fue confirmado por más trabajos que identificaron hasta 6 unidades proteicas (Xie et al., 2007) proponiendo una función para la incorporación de proteínas y el mantenimiento de la morfología mitocondrial. A este complejo se denominó MINOS, de “*mitochondrial inner membrane organizing system*” (von der Malsburg et al., 2011); MitOS, de “*mitochondrial organizing structure*” (Hoppins et al., 2011); y MICOS, de “*mitochondrial contact site*” (Harner et al., 2011), que se unificaron en el término “*mitochondrial contact site and organizing system*”, MICOS (Pfanner et al., 2014). A sus subunidades proteicas se les denominó “Mic” seguido de su peso molecular. A día de hoy, hay identificadas hasta 9 Mic distintas en mamíferos (Kozjak-Pavlovic, 2017). Se ha identificado una fuerte interacción de estos complejos con unas proteínas de la MME con una estructura característica de barril beta, denominadas “*sorting and assembly machinery*” (SAM). De esta interacción, se ha sugerido la formación del sistema “*intermembrane space bridging complex*” (MIB) (Ott et al., 2012), que establece interacciones con otros elementos mitocondriales, siendo importante para el transporte de proteínas, la estabilidad del ADN mitocondrial, la respiración celular, el potencial de membrana mitocondrial o la producción de ATP (Kozjak-Pavlovic, 2017).

Incluso se ha especulado sobre la posibilidad de que este sistema esté implicado en la interacción de la mitocondria con el retículo endoplásmico (van der Laan et al., 2012).

La distinta localización de estos dos principales sistemas de modelado de las crestas, parece indicar que regulan aspectos complementarios de su morfología. Pero esto no lo hacen de forma totalmente independiente, pues hay evidencias de la interacción entre el sistema MICOS y la F_1F_0 -ATP sintasa. Se ha visto que distintas proteínas mitofilina condicionan la oligomerización de la F_1F_0 -ATP sintasa, siendo necesario un balance adecuado en estas interacciones para una correcta morfología mitocondrial (Rampelt and van der Laan, 2017). Además, la mitofilina Mic10 parece interaccionar con la F_1F_0 -ATP sintasa de manera independiente del resto del complejo MICOS, estabilizando así su oligomerización (Rampelt et al., 2017a).

La proteína GTP-asa similar a dinamina OPA1, también llamada proteína de atrofia óptica, se relacionó en un primer momento con la dinámica mitocondrial y la fusión de las membranas externas (Sesaki et al., 2003, Wong et al., 2003), pero se ha visto que también está implicada en la formación y mantenimiento de las crestas (Amutha et al., 2004, Frezza et al., 2006, Meeusen et al., 2006). Silenciando la expresión de la proteína en células HeLa, se comprobó que producía la fragmentación de la red mitocondrial, la disipación del potencial de membrana mitocondrial y una drástica desorganización de las crestas, acompañados de la liberación de citocromo C (Olichon et al., 2003). Este efecto regulador de la dinámica de las crestas de OPA1 también fue confirmado en fibroblastos (Frezza et al., 2006). Opa1 se expresa como al menos 8 ARNm diferentes generados por *splicing* alternativo (Delettre et al., 2000), y la peptidasa de procesamiento mitocondrial (PPM) produce de cada ARNm una isoforma de alto peso molecular (L-Opa1) que pueden sufrir un posterior procesamiento proteolítico en el espacio intermembrana (proteasas OMA1 y Yme1L) y en la matriz mitocondrial, generando isoformas más pequeñas (S-OPA1). El balance entre ambas isoformas es transcendental para el control de la morfología mitocondrial, pues un aumento en el procesado de L-OPA1 hacia S-OPA1 provoca fragmentación mitocondrial, mientras que su inhibición promueve la extensión de la red mitocondrial. Además, se demostró que el control de este procesamiento proteolítico de OPA1, además de estar controlado por las proteasas Yme1L y OMA1, también lo hace el potencial de membrana mitocondrial y estímulos proapoptóticos (Ishihara et al., 2006, Griparic et al., 2007, Song et al., 2007).

Las funciones OPA1 están asociadas con sus isoformas y con dominios específicos. El trabajo de Valentida Del Dotto comprobó, en fibroblastos de embriones de ratón OPA1^{-/-} en los que expresaban específicamente las isoformas de OPA1, que cualquiera de ellas es capaz de restaurar la estructura de las crestas y mantener el ADN mitocondrial y la eficiencia energética, pero sin recuperar la morfología de la red mitocondrial. También comprobaron que las formas L-OPA1 mantenían la fusión mitocondrial, mientras que las formas S-OPA1 restauraban principalmente la función energética. Pero para rescatar completamente la función y la morfología mitocondrial, era necesario un correcto balance entre las formas L-OPA1 y S-OPA1, de al menos dos isoformas (Del Dotto et al., 2017) (**Figura 10**).

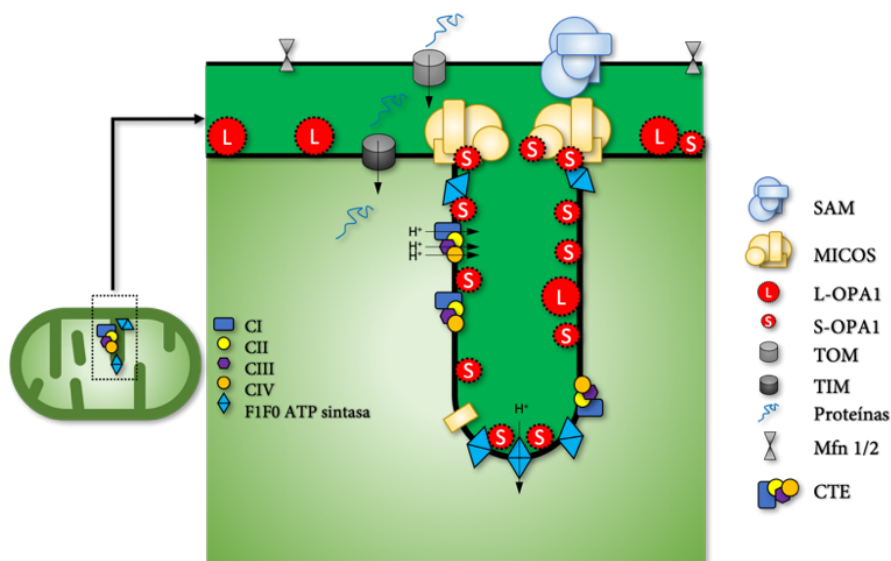


Figura 10. Disposición de las isoformas L-OPA1 y S-OPA1 en las crestas y la MMI. L-OPA1 se encuentra principalmente en la MMI controlando la fusión de membranas mientras que S-OPA1 se encuentra principalmente en las crestas controlando las funciones energéticas mediante el anclaje de los complejos. Imagen adaptada de (Del Dotto et al., 2017, Rampelt et al., 2017b).

Algunas mutaciones en el gen de OPA1 se asocian a neuropatías graves como la atrofia óptica autosómica dominante, que produce pérdida de visión y de la audición y alteraciones motoras. Se comprobó que los fibroblastos derivados de estos pacientes presentan estructuras de cresta aberrantes (Agier et al., 2012) y, a partir de numerosos estudios de estas mutaciones, se comprobó la importancia de OPA1 en muchas más funciones, como la producción de energía (Chevrollier et al., 2008), la dinámica del calcio (Dayanithi et al., 2010), el mantenimiento del ADNm (Amati-Bonneau et al., 2008, Hudson et al., 2008, Elachouri et al., 2011), el estrés oxidativo (Millet et al., 2016), la inflamación (Kane et al., 2017), el envejecimiento (Sarzi et al., 2012) o la neurogénesis (Bertholet et al., 2013).

5.4. Funciones de la mitocondria

La mitocondria está implicada en numerosos procesos celulares centrados en obtener energía, mantener el metabolismo y regular cascadas de señalización. Para una correcta función mitocondrial, su estructura, su localización en la célula y su proteoma son críticos. A continuación, se describe brevemente las principales funciones que desempeña, resumidas en la **Figura 11**.

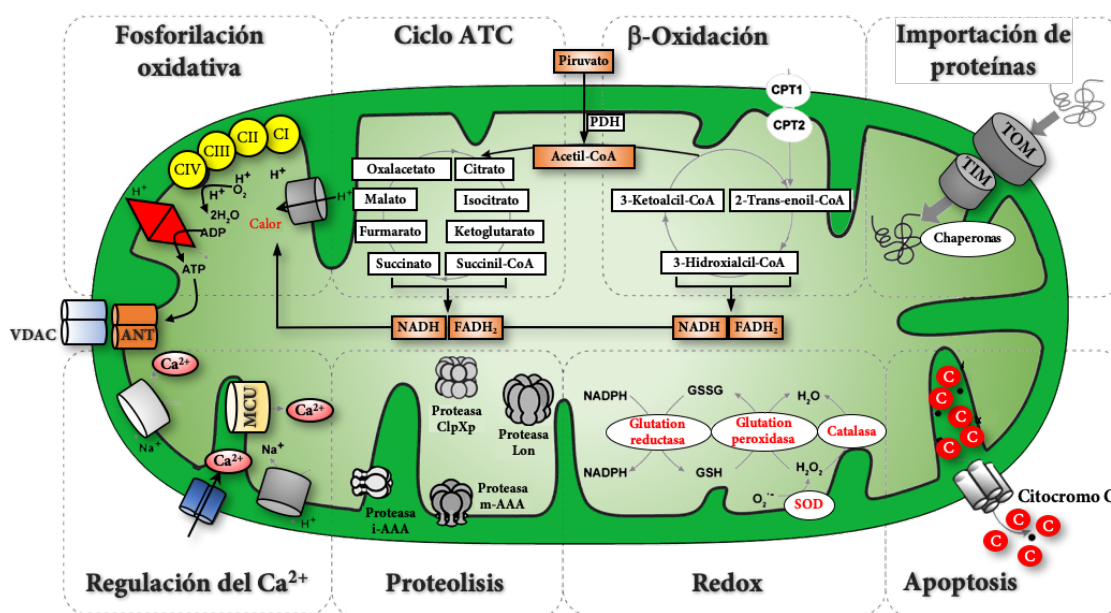


Figura 11. Resumen de las principales funciones mitocondriales junto a los elementos que las integran. Imagen adaptada de (Zhang et al., 2012).

a) Energética: La principal función y de las más estudiada por su trascendencia en la supervivencia celular es su capacidad de producir energía en forma de ATP, que posteriormente es utilizado en la mayoría de procesos celulares. El piruvato, que se obtiene a partir de la glucosa en el citosol mediante la glucólisis, puede reducirse a lactato en condiciones anaeróbicas o entrar en la mitocondria e iniciar una serie de reacciones de oxidación en condiciones aeróbicas, por lo que también se llama respiración celular. En la matriz mitocondrial se transforma en acetil coenzima A (acetil-CoA) e inicia el ciclo de Krebs (o ciclo de los ácidos tricarboxílicos), un proceso de reacciones de oxidación encadenadas donde producen dos moléculas de ATP, y las coenzimas reducidas NADH y FADH₂. Estas coenzimas cargadas de electrones son los productos obtenidos de mayor interés para la producción de energía. En la cadena de transporte electrónico (CTE), que está formada por 4 complejos proteicos alojados mayoritariamente en las crestas, se oxidan cediendo sus electrones (el

NADH en el complejo I y el FADH₂ en el complejo II). Los electrones pasan de uno a otro complejo gracias a la oxidación/reducción de la molécula de ubiquinona/ubiquinol y del citocromo C. Al final de esta cadena, el complejo IV reduce el oxígeno y produce una molécula de H₂O. Durante el proceso de intercambio de electrones, los complejos I, III y IV bombean protones hacia el interior de la cresta y el espacio intermembrana, generando una fuerza protón-motriz que es aprovechada por la F₁F₀-ATP sintasa (o complejo V) para producir ATP, completando así la fosforilación oxidativa. La CTE junto a la F₁F₀-ATP sintasa forman el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Este proceso arroja un balance energético global de 38 ATP por cada molécula de glucosa, mucho más eficiente que si lo comparamos a los 2 ATP que se consiguen si metabolismo es anaeróbico y se dirige hacia la formación de lactato. La diferencia de potencial eléctrico (alrededor de -180 mV) que se genera, gracias al bombeo de protones, se denomina potencial de membrana mitocondrial; es imprescindible mantenerlo para un buen funcionamiento mitocondrial ya que, además de servir como motor para la producción de ATP, también condiciona la captación del catión calcio (Ca²⁺) o la importación de nutrientes, el ADP, el fósforo inorgánico y las proteínas. Otra ruta energética importante que se lleva a cabo en la mitocondria es la beta oxidación de ácidos grasos, en la que los ácidos grasos inician una ruta catabólica cíclica que acorta su cadena en 2 átomos de carbono por cada ciclo en forma de acetil-CoA (que posteriormente iniciará el ciclo de Krebs).

b) Regulador de la señal de calcio: La mitocondria junto con el RE regulan la concentración de calcio intracelular. A través de canales y bombas, capta calcio citosólico a gran velocidad (siendo la vía principal el uniportador mitocondrial) y lo redistribuye lentamente al citosol a través del intercambiador sodio/calcio mitocondrial (NCXm). De esta manera, se regula la señalización de calcio en espacio, concentración y tiempo, controlando procesos como el movimiento de vesículas de secreción, la exocitosis, la dinámica del citoesqueleto e incluso la muerte celular (Garcia et al., 2006). Además de distribuir el calcio, tienen capacidad de almacenarlo en forma de precipitados.

c) Metabolismo: La mitocondria es un elemento clave para la síntesis de numerosos componentes celulares, como lípidos, proteínas, hormonas esteroideas o cofactores como el grupo hemo. La mayoría de los lípidos se sintetizan en el RE y se importan a través de las MAMs. Sin embargo, la mitocondria forma fosfolípidos como el ácido fosfatídico, el fosfatidilglicerol, la fosfatidil etanolamina y la propia cardiolipina (Osman et al., 2011, Horvath and Daum, 2013). En cuanto a las proteínas, la mitocondria posee una completa maquinaria

para su importación (ej. TIM y TOM), síntesis y procesado mediante diferentes chaperonas (ej. CCS y Hsp70) y proteasas (ej. i-AAA o m-AAA).

d) Equilibrio redox: Debido al ambiente oxidante que existe en la mitocondria, fruto de las reacciones metabólicas y la cadena de transporte electrónico en la que existe una pequeña fuga de electrones, en la mitocondria existe un importante grupo de enzimas y moléculas encargadas de mantener el balance redox y evitar el estrés oxidativo. Las principales son el glutatión (GSH) y las enzimas glutatión reductasa (GRs), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), y superóxido dismutasa (SOD1). El control de los radicales libres en este ambiente es muy importante, pues su generación incontrolada produciría reacciones de oxidación en cadena dañando lípidos, proteínas e incluso el ADN, comprometiendo la viabilidad celular.

e) Apoptosis: La vía intrínseca de la apoptosis se inicia en la mitocondria, y se activa por estímulos de daño y estrés celular (Wang and Youle, 2009, Parsons and Green, 2010), que determinan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial por medio de la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM) y la consiguiente liberación del citocromo c al citosol, que forma el apoptosoma junto a dATP, Apaf-1 y la caspasa 9 iniciadora, escindiendo y activando el resto de caspasas efectoras. El proceso se favorece con la liberación de otros mediadores como las proteínas Smac/Diablo que a su vez activan las caspasas. La permeabilidad de la MME que inicia la apoptosis está regulada por las proteínas de la familia Bcl-2, que se dividen en 3 grupos: pro-apoptóticas (Bax, Bak y Bok), antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1, Boo/Diva) y solo BH3 (Bid, Bin, Noxa, Puma, Bmf, Bad, Bik, Blk, y Hrk/DP5) que regulan las otras dos clases (Parsons and Green, 2010), pero existen otras vías como la participación de OPA1, explicada anteriormente.

6. ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

La relación entre mitocondria y algunas enfermedades es hoy evidente. El primer caso comunicado fue una paciente con hipermetabolismo no relacionado con disfunción tiroidea, que por análisis morfológicos y bioquímicos observaron mayor número de mitocondrias y pérdida del acoplamiento en la fosforilación oxidativa. Este hallazgo del grupo de Rolf Luft de la Universidad Karolinska de Estocolmo, fue el inicio de la era de la medicina mitocondrial. A lo largo de los años 70 se descubrieron más deficiencias metabólicas y enzimáticas y, en 1988, se comunicó la primera enfermedad asociada a mutaciones del ADN_m (Wallace, 2010). Desde entonces se han descrito más de 150 mutaciones y deleciones implicadas en enfermedades

humanas. Cuando su origen son mutaciones del ADN mitocondrial o del ADN nuclear que codifica proteínas mitocondriales, se denominan enfermedades mitocondriales primarias. Sin embargo, en determinadas ocasiones el problema surge de manera secundaria a otras patologías que terminan alterando la función mitocondrial. En el caso de las enfermedades cuya fisiopatología es multifactorial, que no disponemos de ningún tratamiento eficaz, y que sabemos que desencadenan una alteración mitocondrial secundaria, la estrategia de intentar recuperar la función mitocondrial está ganando interés creciente. Este es el caso de las distintas enfermedades neurodegenerativas, el daño producido por un proceso de isquemia-reperfusión, procesos de inflamación crónica, distrofias musculares, la insuficiencia cardíaca o el síndrome metabólico (Murphy and Hartley, 2018).

Las enfermedades mitocondriales son multisistémicas, afectando a órganos y tejidos no relacionados entre sí. Pueden presentar una serie de aspectos clínicos, morfológicos y bioquímicos muy concretos que dan lugar a síndromes bien caracterizados; pero en la mayor parte de los casos los síntomas son muy poco informativos y es la presencia de anormalidades neurológicas, a veces acompañadas de aumento de ácido láctico y de otros síntomas clínicos secundarios que afectan a diversos órganos, lo que da alguna orientación en el diagnóstico de una enfermedad mitocondrial. Como ejemplos de estas enfermedades, podemos citar la atrofia óptica dominante, la paraplejia espástica hereditaria, la ataxia de Friedreich, la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), la oftalmoplegia externa progresiva o los síndromes de MELAS (encefalia mitocondrial, acidosis láctica y episodios de accidentes cerebrovasculares), MERRF, NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa), Kearns-Sayre, Leigh, o Pearson.

7. MITOCONDRIA Y ELA

La disfunción mitocondrial es una característica común en las distintas enfermedades neurodegenerativas, incluso con etiologías muy diversas. Se ha descrito tanto en el alzheimer como en el parkinson, en la enfermedad de Huntington y en la ELA (para una revisión, ver (Lin and Beal, 2006, Schon and Przedborski, 2011, Wang et al., 2019)). En la ELA se ha descrito disfunciones mitocondriales tanto en las formas esporádicas como en las familiares y un tercio de los genes relacionados con la ELA están asociados a funciones mitocondriales (Smith et al., 2017). De manera general, las consecuencias directas de esta disfunción son alteraciones en la fosforilación oxidativa, producción excesiva de ROS, alteración en el tamponamiento de calcio, en la dinámica y morfología mitocondrial o la activación de vías de apoptosis. Dado

que la mitocondria interviene en tantos procesos celulares, su participación en las enfermedades neurodegenerativas también puede darse de forma directa o indirecta.

Las singularidades de las neuronas pueden estar detrás de esta sensibilidad ante una disfunción mitocondrial. Presentan una elevada demanda energética y metabólica, pues en reposo consumen el 20 % del ATP cuando representan tan solo el 2 % de la masa corporal, y carecen de depósitos de energía limitados. Además, su nula tasa de recambio implica que acumulan los daños durante toda la vida del organismo. Por otro lado, el proceso de neurotransmisión conlleva una fina gestión del calcio citosólico, y es ahí donde la disfunción mitocondrial podría, una vez más, comprometer la función principal de la neurona.

En la ELA existen evidencias de daño mitocondrial en la mayoría de los modelos animales *in vivo* e *in vitro* (Dal Canto and Gurney, 1994, Higgins et al., 2003, De Vos et al., 2007, Wang et al., 2013), y también en pacientes de ELA con las formas familiar y esporádica (Sasaki and Iwata, 2007). Las alteraciones se han descrito en una gran variedad de modelos experimentales, tipos celulares y estadios de la enfermedad; por ello la información de que disponemos es difícil de integrar. En líneas generales, el daño estructural que se observa es hinchamiento y vacuolización de las mitocondrias, su fragmentación en mitocondrias pequeñas, una disminución en la movilidad y la acumulación formando grupos. También se encontró desorganización y pérdida de las crestas mitocondriales (Kirkinezos et al., 2005, Deng et al., 2006, Stribl et al., 2014, Deng et al., 2015, Gautam et al., 2016, Onesto et al., 2016). A nivel funcional, parece haber consenso en una menor actividad de la CTE, de enzimas como la citrato sintasa o la citocromo c oxidasa, una menor respiración mitocondrial, capacidad de síntesis de ATP disminuida, menor potencial de membrana y menor capacidad tamponadora de calcio.

Es pertinente destacar que el daño mitocondrial no es exclusivo de la motoneurona. Aunque numerosos trabajos lo situaban como específico de la motoneurona y del asta anterior en la médula espinal (Jung et al., 2002), se ha demostrado que está presente en más tipos celulares como en neuronas propioceptivas del ganglio de la raíz dorsal (Sabado et al., 2014), fibroblastos (Allen et al., 2014, Allen et al., 2015, Raman et al., 2015, Onesto et al., 2016), astrocitos (Cassina et al., 2008, Yamanaka et al., 2008, Pehar et al., 2014), microglía (Boillee et al., 2006), músculo esquelético (Wiedemann et al., 1998, Vielhaber et al., 1999, Menzies et al., 2002b, Echaniz-Laguna et al., 2006) y osteocitos (Wang et al., 2018). Los fibroblastos derivados

de pacientes son un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la función mitocondrial debido a su facilidad de biopsia frente a músculo o la médula espinal. Además, en el modelo SOD1 se ha podido demostrar que existe deterioro mitocondrial a edades presintomáticas (Kong and Xu, 1998, Kirkinezos et al., 2005, Vande Velde et al., 2011), incluso antes de observar pérdida motoneuronal. Estos estudios con modelos a edad presintomática son muy importantes para evaluar la causalidad de la enfermedad.

Por lo tanto, las evidencias de las que disponemos señalan a la mitocondria como una vía central en la patogénesis de la ELA. Se ve afectada en estructura y función en la mayoría de los modelos, en distintos tejidos y su afectación presintomática podría indicar que se trate más una causa que una consecuencia. Además, se observa una progresión en la gravedad de las alteraciones a medida que avanza la enfermedad.

8. SOD1^{G93A} Y MITOCONDRIA

Siendo la SOD1 una enzima fundamentalmente citosólica, el descubrimiento de la localización y acumulación de la enzima mutada en la mitocondria fue un hallazgo importante para investigar sobre su toxicidad. Además, la acumulación de proteínas mal plegadas y su agregación es característica en muchas enfermedades neurodegenerativas, aunque en el caso de la mutación hSOD1^{G93A} se valora que la forma soluble sea incluso más tóxica que los precipitados que pueda llegar a formar (Tafuri et al., 2015). Se ha descrito su localización en todos los compartimentos mitocondriales. Aunque su localización principal es la membrana externa mitocondrial y el espacio intermembrana (Higgins et al., 2002, Liu et al., 2004, Sasaki et al., 2004, Deng et al., 2006), también se encontró en la membrana interna mitocondrial (Ahtoniemi et al., 2008) y en la matriz (Vijayvergiya et al., 2005).

Al igual que otras proteínas relacionadas con la ELA, la SOD1^{G93A} interacciona con la mitocondria provocando un daño directo. Las interacciones mejor descritas son con las translocasas TOM y TIM, impidiendo la correcta importación de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo (Liu et al., 2004); con la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Pasinelli et al., 2004) a la que le provoca un cambio estructural y deja expuesto el dominio tóxico BH3 que inicia la apoptosis (Pedrini et al., 2010) en las que además, el complejo SOD1-Bcl-2 impide su interacción fisiológica con VDAC1 provocando alteraciones en la permeabilidad mitocondrial (Tan et al., 2013).

También se asocia el efecto de la SOD^{G93A} en la mitocondria a la reducción de la respiración mitocondrial por la alteración de los complejos respiratorios II, III, y IV, lo que conlleva a una menor síntesis de ATP (Browne et al., 1998, Mattiazzi et al., 2002, Menzies et al., 2002a, Loizzo et al., 2010), incluso en etapas presintomáticas (Kirkinezos et al., 2005, Browne et al., 2006).

Además, el propio estrés oxidativo que se genera en la mitocondria afecta a la propia SOD1, tanto mutada como fisiológica, provocando su oxidación y una alteración estructural que, como ya hemos visto, provoca a su vez agregación y disfunción mitocondrial, ampliándose así la lesión por radicales libres (Rakhit et al., 2002).

La mayoría de los trabajos describieron estas interacciones como específicas de mitocondrias de la motoneurona y la médula espinal (Liu et al., 2004, Pasinelli et al., 2004, Vande Velde et al., 2008), pues en otros órganos como el músculo o el hígado, la interacción de la enzima mutada con la mitocondria era mucho menor. Estos hallazgos ponen de manifiesto la heterogeneidad de las mitocondrias entre tejidos, y la importancia de su particular fenotipo proteico (Mootha et al., 2003, Kislinger et al., 2006).

9. BIOENERGÉTICA EN ELA

La disfunción mitocondrial es un término muy amplio, que está descrito en múltiples enfermedades con etiologías muy diversas debido a la multitud de funciones de la mitocondria. La alteración de cualquiera de ellas se engloba dentro de este término, como es el caso de la disfunción bioenergética. En el caso de la ELA, se ha descrito una alteración en el metabolismo energético tanto en pacientes como en distintos modelos experimentales, que correlaciona con la progresión de la enfermedad. Además, las motoneuronas muestran mayor susceptibilidad a este tipo de alteraciones, pues son muy vulnerables a una disminución del aporte energético por presentar un elevado consumo energético y unos depósitos limitados, lo que precisa de un aporte continuo de energía.

A nivel sistémico la homeostasia energética es el balance entre aporte y gasto de energía, que condiciona el peso corporal. Tanto los pacientes de ELA como los distintos modelos murinos de ELA muestran una disminución en los depósitos de grasa y pérdida de peso, lo que se utiliza como factor pronóstico pues aquellos pacientes que presentan pérdida de peso pre-diagnóstico evolucionan de una forma más agresiva (Jawaid et al., 2010, Peter et al., 2017). Esta

hipolipidemia asociada a los pacientes de ELA sucede incluso en etapas presintomáticas en los modelos murinos. Además, en los modelos animales se ha visto que una mayor cantidad de colesterol y apoproteína E prolonga la vida, mientras que las estatinas producen un empeoramiento de la enfermedad. Por el contrario, la obesidad está relacionada con menor riesgo de padecer ELA (O'Reilly et al., 2013). También se ha observado que los diabéticos presentan un retraso en la aparición de los síntomas, y se comprobó que los pacientes de ELA desarrollan resistencia a insulina, posiblemente por la atrofia muscular, dado que el músculo es un gran reservorio y consumidor de glucosa (Vandoorne et al., 2018).

La alteración metabólica se ha abordado como diana para el tratamiento de la ELA, intentando aumentar la disponibilidad de sustratos energéticos o mejorando la función mitocondrial. Se han probado moléculas de amortiguación y transporte energético (creatina); moléculas contra el estrés oxidativo (coenzima Q10, MitoQ, dextraprimexil y edavarone); sustratos energéticos (dietas hipercalóricas, cuerpos cetónicos, triglicéridos de cadena mediana, piruvato) o inductores de la función mitocondrial, que mejoran su eficiencia metabólica (dicloroacetato y acetil-L-carnitina) (Vandoorne et al., 2018). Para una ampliación de los tratamientos metabólicos probados en ELA, ver Anexo 3. No obstante, es necesario entender mejor como las diferentes vías metabólicas confluyen y contribuyen a la etiología de la ELA.

9.1. Metabolismo en SNC: neuronas y glía

Para entender la alteración metabólica en la ELA y su relación con la muerte neuronal, debemos contextualizar las peculiaridades metabólicas en el SNC donde el sustrato energético por excelencia es la glucosa. Los ácidos grasos no son un sustrato de elección en este sistema pues se distribuyen con dificultad, su oxidación consume mucho oxígeno, y generan gran cantidad de radicales libres.

En condiciones normales (y en presencia de oxígeno) la glucosa se metaboliza mediante la glucólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, generando un alto rendimiento. En caso de un déficit de oxígeno o en determinados tipos celulares como la glía, la glucosa se cataboliza mayoritariamente mediante glucólisis y el piruvato se transforma en lactato. En el control de este catabolismo hacia una vía anaeróbica u oxidativa es crucial la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) que limita la entrada del sustrato al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Esta enzima es más activa en neuronas que en glía, de ahí que la glía mantenga un metabolismo

más glucolítico con alta producción de lactato (mecanismo anaeróbico, rápido y de baja eficiencia energética), mientras que las neuronas sean más oxidativas (más lento, pero de mayor eficiencia energética). Ese lactato producido por la glía se transforma en el sustrato con el que nutre a las neuronas a través de la lanzadera de lactato, ejerciendo así su papel como soporte nutricional en el SNC.

Por otro lado, mientras la glía fabrica los depósitos de glucógeno a partir de la glucosa, la neurona dirige su consumo hacia una importante actividad de la vía de las pentosas fosfato, para mantener el control antioxidante celular, puesto que así genera el NADPH necesario para regenerar el glutathione reducido. Esto se debe a que la mayor actividad oxidativa de la neurona también le confiere un mayor estrés oxidativo, por lo que es imprescindible controlar el flujo de la glucosa hacia la glucólisis o la vía de las pentosas fosfato para mantener el equilibrio. El alto consumo de ATP, junto a la baja reserva de sustratos, hacen que el sistema creatina/fosfocreatina (como portador del fósforo) en la neurona sea muy importante para conectar los sitios de creación y consumo de energía. Para ver un esquema con las diferencias en el metabolismo de la glucosa en las motoneuronas y la glía, ver **Anexo 4**.

Cada perfil metabólico se ve más representado cuanto mayor sea la actividad celular, pero ninguno es exclusivo, pues todos los procesos suceden a la vez. Lo que varía en cada caso es su contribución al balance metabólico global de la célula. Por lo tanto, vemos que cada tipo celular mantiene un metabolismo característico derivado de su funcionalidad, su anatomía y el microambiente. Esto apoya la idea de que un fracaso metabólico pueda estar detrás de una degeneración selectiva de la motoneurona. Por lo tanto, la motoneurona presenta un difícil control de la homeostasia energética, precisando un continuo aporte de energía; por ello, la disfunción mitocondrial en ELA puede ser crucial en este aspecto, haciendo a las motoneuronas todavía más susceptibles al estrés energético. Además, el hecho de que las neuronas motoras de fatiga rápida (fibras blancas), que son aquellas con mayor necesidad puntual de ATP, sean las más afectadas en la ELA, en comparación con las fibras lentas, apoya esta hipótesis (Nijssen et al., 2017).

En la ELA se produce un descenso en la captación de glucosa en el córtex de los pacientes, que ha sido valorado como marcador diagnóstico temprano (Vandoorne et al., 2018). En el modelo de ratón SOD1^{G93A}, también disminuye la captación de glucosa en la médula espinal con el avance de la enfermedad, pero contrasta con los mayores niveles de glucógeno

encontrados (Dodge et al., 2013). Esto indica una alteración en el catabolismo de la glucosa en el SNC durante la ELA. No obstante, en estos estudios existe controversia de si esto sucede específicamente en motoneuronas o en glía, debido a la heterogeneidad en la proporción de ambos tipos celulares en el córtex y en la médula espinal. Además, hay que tener en cuenta que está bien descrita la menor expresión de los transportadores de lactato y de glutamato en oligodendrocitos y astrocitos de pacientes ELA, lo que apoya la teoría de que la afectación de estas células también contribuye a las alteraciones metabólicas descritas. En la motoneurona se ha visto una activación del sensor celular de energía (AMPK), que se activa cuando disminuye la disponibilidad energética, promoviendo vías catabólicas e inhibiendo las anabólicas (Vamdoorne, 2018).

10. LA GLÁNDULA ADRENAL

La glándula adrenal forma parte del sistema endocrino, cuya función es producir y secretar hormonas al torrente sanguíneo para la coordinación de la actividad y homeostasia de las células y tejidos del organismo. La función principal de glándula adrenal está relacionada con combatir el estrés del organismo.

Anatómicamente, las glándulas adrenales derecha e izquierda se encuentran en el espacio retroperitoneal de la cavidad abdominal, asociadas a los polos superiores de los riñones, por lo que también se denominan glándulas suprarrenales. En el humano tiene forma triangular y en el ratón es ovalada y se puede encontrar más separada del riñón. Es un órgano fuertemente irrigado, en el que la sangre pasa desde las zonas más externas corticales de la glándula hacia el interior medular, donde confluye en una vena central adrenomedular, la cual desemboca en la vena cava y la vena renal, distribuyendo así al resto del cuerpo todos los productos secretados por la glándula. La disposición que mantiene la irrigación de la glándula permite que los esteroides liberados por la corteza ejerzan una acción paracrina sobre la médula adrenal (Kawata et al., 1994, Bornstein et al., 1997).

Se encuentra cubierta por una cápsula de tejido conjuntivo, mientras que el tejido parenquimatoso secretor está organizado en dos regiones muy diferenciadas según su origen embriológico y su función: la zona cortical, compuesta por tejido endocrino, y la zona medular, compuesta de tejido neurosecretor, con la peculiaridad de que en vez de inervar un órgano diana, secreta su contenido al torrente sanguíneo.

La corteza suprarrenal se encuentra en la parte más externa y representa el 80-90 % de la glándula, es de origen mesodérmico y produce hormonas esteroideas relacionadas con la respuesta al estrés. Se subdivide a su vez en tres zonas según la disposición y función de las células que contiene (**Figura 12**): la zona glomerular (10-15 %), con células organizadas en glomérulos que producen mineralocorticoides (principalmente aldosterona) y se encarga del equilibrio electrolítico así como de la presión sanguínea y la volemia; la zona fascicular (75 %), con células organizadas en cordones longitudinales que producen glucocorticoides (mayoritariamente cortisol) y que se encargan del metabolismo de lípidos, proteínas y glucosa, de la inflamación y de la inmunidad; y finalmente la zona más interna, que es la zona reticular (5-10 %), formada por células que crean una red anastomosada de cordones celulares cortos que producen hormonas sexuales masculinas (andrógenos) con funciones en la diferenciación sexual y metabólicas. En la parte más interior de la glándula se encuentra la médula suprarrenal, que representa el 10-20 % de la glándula. Su origen es neuroectodérmico y produce catecolaminas principalmente. Las células principales que componen la médula suprarrenal son las células cromafines, término acuñado por el histólogo Alfred Kohn por el color amarillo-parduzco que adquieren al teñirlas con sales de cromo. A continuación, nos centraremos en este tipo celular, pues es utilizado como modelo de estudio de la alteración mitocondrial en ELA en esta Tesis Doctoral.

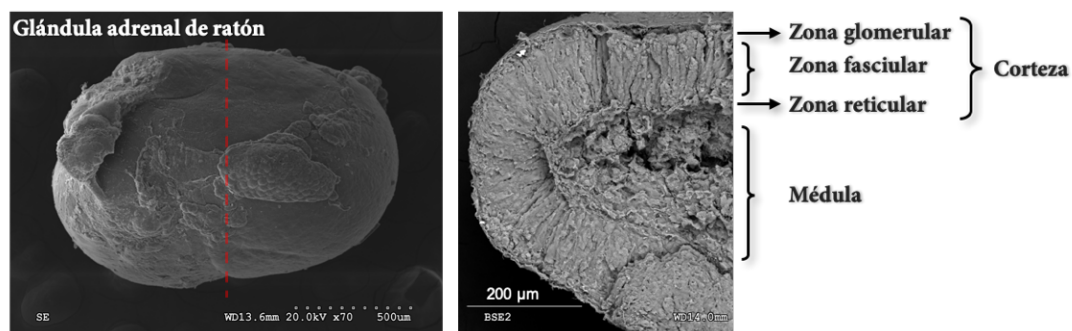


Figura 12. Imagen de microscopía electrónica de barrido de una glándula adrenal de ratón, junto a un corte longitudinal histológico en el que se diferencian las distintas capas y sus zonas.

11. LA CÉLULA CROMAFÍN

Estas células neuroendocrinas derivan de la cresta neural y forman parte de la rama simpática del sistema nervioso autónomo (SNA). Durante la quinta semana del desarrollo embriológico, la cresta neural de la región torácica origina neuroblastos que forman a cada lado ganglios simpáticos en cadena, y que se extienden hacia las regiones cervical y lumbosacra. Desde estos ganglios simpáticos se originan algunas células que migran hacia una

incipiente corteza suprarrenal originando las simpatogonias. Estas células se diferenciarán en células cromafines y formarán parte de la médula suprarrenal (Aloe and Levi-Montalcini, 1979, Anderson, 1993, Tischler, 2002). Las células cromafines se consideran neuronas postganglionares simpáticas modificadas ya que carecen de las prolongaciones (de tipo axónicas o dendríticas) necesarias para inervar un órgano diana y vierten sus secreciones directamente a la sangre, que actúan a distancia como neurohormonas. Las células cromafines se agrupan formando cordones epitelioides rodeados por capilares fenestrados, y dada su naturaleza derivada del sistema nervioso simpático, se encargan de sintetizar, almacenar y liberar las catecolaminas adrenalina (80 %) y noradrenalina (20 %), siendo la mayor fuente de estas en el organismo. Su almacenamiento se realiza en unos gránulos característicos denominados gránulos cromafines. Son estimuladas por terminales preganglionares colinérgicas del sistema simpático, concretamente por el nervio esplácnico (Feldberg et al., 1934). Pero a diferencia del resto de ganglios simpáticos, el neurotransmisor liberado es mayoritariamente adrenalina en vez de noradrenalina (Podvin et al., 2015). Esta secreción está regulada tanto neurogénicamente por las fibras nerviosas esplácnicas como por hormonas (la propia noradrenalina circulante, histamina, corticosteroides, o angiotensina entre otras) y mensajeros autocrinos y paracrinos (como ATP, opioides o GABA) (de Diego and Garcia, 2018).

Las células cromafines presentan una apariencia poligonal, pero de forma aislada en cultivo celular adoptan una forma esférica de 10-15 μm de diámetro. Su núcleo se dispone de manera excéntrica y en el citoplasma presentan gran cantidad de gránulos electrodensos (12000-30000 por célula), con un diámetro medio de 150 y 400 nm, variando en función de la especie (Burgoyne, 1991, Plattner et al., 1997). En estos gránulos densos es donde se almacenan las catecolaminas, junto a otras sustancias que se liberan concomitantemente como neuropéptidos, encefalinas, opioides, ATP, cromograninas, enzimas o calcio) (Diaz-Flores et al., 2008).

11.1. Funciones de la célula cromafín

Las células cromafines modulan a nivel sistémico la respuesta simpática generalizada, que es de vital importancia en las situaciones de miedo, amenaza o estrés físico y psicológico. Ejemplos que desencadenan esta respuesta, denominada de “lucha o huida”, son: la hipoxia, la hipoglucemia, una fuerte hipovolemia por una hemorragia, una situación de hipotensión, el ejercicio físico, la exposición al frío, un shock anafiláctico, una crisis asmática o una situación

que provoca miedo (Coupland, 1989, Aunis and Langley, 1999). Esto lo consigue gracias a su capacidad para secretar súbitamente grandes cantidades de catecolaminas al torrente sanguíneo, ejerciendo una acción simpaticomimética en la mayoría de los órganos, dada la amplia distribución de los receptores α - y β - adrenérgicos en el organismo. La interacción de la adrenalina con los receptores conduce a un estado de alerta, pues se produce el aumento de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial, la distribución de la sangre hacia los músculos y cerebro, la dilatación de bronquios y pupilas para mejorar la respiración y la visión, así como la movilización de las reservas energéticas mediante glucólisis hepática y lipólisis en adipocitos. Todas estas acciones fisiológicas producidas por la descarga de catecolaminas por parte de la célula cromafín favorecen la capacidad de reacción del organismo para intentar resolver la situación de estrés (Tank and Lee Wong, 2015).

11.2. La célula cromafín como modelo de estudio en investigación básica y en enfermedades neurodegenerativas

Las peculiaridades de la célula cromafín, que comparte funciones neuronales y endocrinas, han sido aprovechadas para el esclarecimiento de muchas funciones celulares y de mecanismos básicos en el campo de la endocrinología, la función neuronal y los mecanismos de secreción (para una revisión, ver (Burgoyne, 1995, Borges et al., 2018). El descubrimiento de que las células cromafines se pueden diferenciar hacia neuronas simpáticas bajo influencia del factor de crecimiento nervioso, ha ayudado al conocimiento del desarrollo neuronal (Aloe and Levi-Montalcini, 1979).

Por otro lado, se trata de células excitables capaces de decodificar e integrar diversas señales, así como de responder con patrones complejos de respuesta eléctrica y secretora. Esto lo consigue gracias a la presencia de una amplia variedad de receptores y canales iónicos, comparable con la de neuronas del SNC (Lingle et al., 2018); ello ha promovido su utilización en multitud de estudios que han ayudado al avance del conocimiento en la electrofisiología: la excitabilidad y la generación de impulsos nerviosos, la transmisión sináptica y las acciones de los fármacos que tiene sus acciones en el SNC. Un ejemplo de la transcendencia de la investigación básica con la célula cromafín en este campo son los trabajos que han llevado a obtener el Premio Nobel en Fisiología o Medicina a los profesores Erwin Neher y Bert Sakmann en 1991, por la invención de las técnicas de patch-clamp y sus estudios en la función de los canales aislados en la célula.

La síntesis, el almacenamiento y la liberación de catecolaminas en sus enormes gránulos se ha aprovechado para avanzar en el conocimiento de la exocitosis y endocitosis regulada. La gran mayoría de las proteínas involucradas en la secreción de vesículas se caracterizó en la célula cromafín (Burgoyne, 1995, Dhara et al., 2018). Los profesores James E. Rothman, Thomas Christian Südhof y Randy Schekman, fueron ganadores del premio Nobel en Fisiología o Medicina en 2013 por sus trabajos en el tráfico vesicular, en los que utilizaron ampliamente la célula cromafín.

En el estudio de la dinámica del calcio durante la neurotransmisión, también se ha utilizado la célula cromafín adrenal. Numerosos trabajos se han centrado en estudiar el acoplamiento estímulo secreción (Douglas and Rubin, 1961), así como la función de una triada funcional que forman los canales de calcio voltaje-dependientes, la mitocondria y el retículo endoplásmico para controlar los microdominios de calcio en concentración, tiempo y espacio (Garcia et al., 2006, Garcia-Sancho et al., 2012).

El último artículo científico firmado por la también premiada por la academia sueca Rita Levi Montalcini (Premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1986 junto a Stanley Choen por el descubrimiento del factor de crecimiento nervioso), lleva por título “la célula cromafín: el cerebro periférico” (Bornstein et al., 2012), en el que detalladamente expone las características que hacen de la célula cromafín una ventana al estudio del cerebro, como su capacidad de recibir estímulos eléctricos y químicos, integrar estas señales y generar distintos patrones de respuesta secretora.

Por último, cabe señalar la importancia de este tipo celular para el estudio de todos los mecanismos citados, que se pone también de manifiesto en la amplia utilización de la línea celular de feocromocitoma (PC12) aislada de un tumor de rata de la médula suprarrenal en 1976 (Greene and Tischler, 1976, Westerink and Ewing, 2008).

Además de los estos estudios fisiológicos citados anteriormente, hay un amplio número de trabajos que utilizan la célula cromafín para estudiar patologías en las que tiene participación la médula adrenal, caso de tumores (los niveles anormales de catecolaminas plasmáticas son pruebas de diagnóstico para el feocromocitoma), la hipertensión arterial (Lim et al., 2002, Miranda-Ferreira et al., 2008, Bomfim et al., 2017), la diabetes (Musial et al., 2017) o el dolor crónico (Arribas-Blazquez et al., 2019). Más recientemente, y gracias al desarrollo animales transgénicos modelos de enfermedades, se han iniciado líneas de investigación

utilizando la célula cromafín de estos animales. Por todo lo expuesto anteriormente, cada vez se acepta más la hipótesis de que el daño que se produce en las neuronas durante estas enfermedades, también se refleja en la función neurosecretora de la célula cromafín, convirtiéndose en una ventana al cerebro para estudiar las bases moleculares de la neurotransmisión en estas enfermedades (de Diego and Garcia, 2018). Ejemplos de estos trabajos son: en enfermedad de Huntington (Mackenzie et al., 2014, Martinez-Ramirez et al., 2018), en esclerosis lateral amiotrófica (Calvo-Gallardo et al., 2015), en la enfermedad de Alzheimer (de Diego et al., 2012) o en el autismo (Calorio et al., 2019).

12. AFECTACIÓN DEL EJE SIMPATO-ADRENAL EN LA ELA

Entre los órganos y sistemas afectados en la ELA se encuentra el sistema nervioso autónomo. Se ha descrito una disfunción del sistema simpático y parasimpático de manera subclínica, que afectan al sistema cardiovascular, sudomotor, gastrointestinal, salivar y lacrimal (Baltadzhieva et al., 2005). La mayoría de los trabajos sugieren la presencia de una hiperactividad simpática, pero en el paciente de ELA esto puede ser una respuesta a la hipoxia que se padece con la enfermedad. Las alteraciones además demuestran que pese a existir una hiperactividad simpática con mayores niveles de catecolaminas en sangre (Yamashita et al., 1997), existe una disfuncionalidad pues paradójicamente va acompañada de denervación simpática cardíaca, disfunción sudomotora y deterioro del reflejo simpático.

En el sistema cardiovascular se han observado variaciones en la presión arterial y mayor frecuencia cardíaca en pacientes de ELA (Sachs et al., 1985, Oey et al., 2002). Mediante un estudio de tomografía computarizada de emisión de positrones, se diagnosticó una denervación simpática posganglionar (Druschky et al., 1999). En el sistema gastrointestinal, el estreñimiento (Nubling et al., 2014), dolor abdominal, vaciado gástrico enlentecido y las náuseas que sufren los pacientes, también se debe en parte a una disfunción autónoma (Toepfer et al., 1999). En cuanto a la función del esfínter urinario se ha descrito un 4 % de incontinencia en pacientes de ELA (Kandinov et al., 2011) y 20 % que presentaban vejiga neurogénica (Shindo et al., 2004) e incontinencia (Nubling et al., 2014).

A nivel de neuropatología de los ganglios simpáticos, se ha descrito un mayor inmunorreactividad para la fosforilación de neurofilamentos de alto peso molecular en pacientes de ELA (Itoh et al., 1992), y en un caso de ELA con mutación en la proteína SOD1 se observó pérdida de núcleos en el núcleo intermediolateral de la médula espinal (Shimizu et

al., 2000), lo que demuestra una alteración del sistema simpático tanto en ELA familiar como esporádica.

Un estudio reciente en el que se analizaron de manera retrospectiva el sistema autónomo en un grupo de pacientes, confirmaron estas alteraciones (Piccione et al., 2015) y definieron los síntomas del SNA como frecuentes (29% de los pacientes) pero modestos, ya que la deficiencia del sistema se presenta hasta en el 75 % de los pacientes. Además, el grupo compara estos datos con un estudio previo en pacientes de enfermedad de Parkinson y con demencia (Low et al., 1997), en el que observaron fallos en el SNA mayores que en el estudio de ELA. Estos datos apoyan la idea de que el SNA también está afectado en enfermedades neurológicas centrales.

Estas alteraciones también se han observado en el ratón SOD1^{G93A}, modelo de ELA familiar. Los trabajos llevados a cabo por Kandinov y colaboradores muestran una mayor frecuencia cardíaca en los ratones a todas las edades (Kandinov et al., 2011), así como una mayor presión arterial (Kandinov et al., 2012). Así se demuestra una alteración en el control cardiovascular en el modelo de ELA comparable a la de los pacientes, y reflejo de una disfunción del SNA por hiperreactividad simpática. Esta alteración surge antes que los síntomas motores, por lo que se descarta que sea secundaria a la sintomatología sistémica. Estos trabajos también sugieren que la muerte súbita que acontece en pacientes de ELA durante el sueño (Shimizu et al., 1994, Asai et al., 2007) y que se atribuye habitualmente a la disfunción respiratoria, puede también deberse a esta alteración simpática. En el estudio inmunohistoquímico del sistema autónomo del ratón SOD1^{G93A} (en el núcleo intermedio lateral, neuronas de la columna vertebral, ganglio cervical superior y glándula adrenal) se observó una menor inmunorreactividad a colino acetil-transferasa en el núcleo intermedio lateral y también a tirosina hidroxilasa en la glándula adrenal, sugiriendo una degeneración preganglionar simpática (Kandinov et al., 2013).

Todas estas alteraciones del sistema nervioso autónomo descritas tanto en pacientes como en el ratón, donde demuestran una alteración ganglionar simpática en ELA, presentan a la célula cromafín como un modelo relevante para el estudio de la enfermedad, con la posibilidad de ser una ventana al cerebro, tal y como describió la Dra. Rita Levi Montalcini.

Nuestro estudio se ha centrado en la célula cromafín de la glándula suprarrenal, componente del SNA y sistema efector del eje simpato-adrenal. Como ya se ha mencionado,

se trata de un gran modelo para los estudios de neurosecreción y ha sido reflejo de alteraciones que se producen en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas. Así, el trabajo publicado por Calvo-Gallardo y colaboradores (2015) se ha centrado en esclarecer si la disfunción sináptica característica de la enfermedad y que se reproduce en el modelo de ratón SOD1^{G93A}, está relacionada con alteraciones en la maquinaria de la exocitosis. Para ello se estudiaron en profundidad los parámetros cinéticos de la liberación de los neurotransmisores, utilizando las células cromafines de ratones sintomáticos. Comprobaron que bajo un estímulo de acetilcolina (el neurotransmisor fisiológico), la liberación de catecolaminas fue más lenta y de mayor contenido por cada evento de exocitosis (medido en las espigas amperométricas generadas). Los datos obtenidos fueron que el tamaño cuántico de las vesículas individuales fue un 52 % mayor, debido a que la cinética de espiga única mostró menor altura máxima (17 % menos) con un menor valor en la ratio de ascenso y de caída (36 % y 61 % menor respectivamente) y consecuentemente un mayor valor de anchura promedia (55 % más) respecto a la espiga del ratón control.

Esta alteración de la exocitosis, se ha visto que va acompañada de alteraciones en la dinámica del calcio intracelular y de un aumento en las corrientes de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV). En el contexto de la triada funcional (formada por estos canales, por la mitocondria y por el retículo endoplásmico), que gestiona los microdominios de calcio intracelular para poder regular procesos como la exocitosis (Garcia et al., 2006), una alteración mitocondrial podría estar relacionada con el origen de estos hallazgos, que además se reproducen de una manera particular en cada una de las distintas enfermedades neurodegenerativas (**Figura 13**).

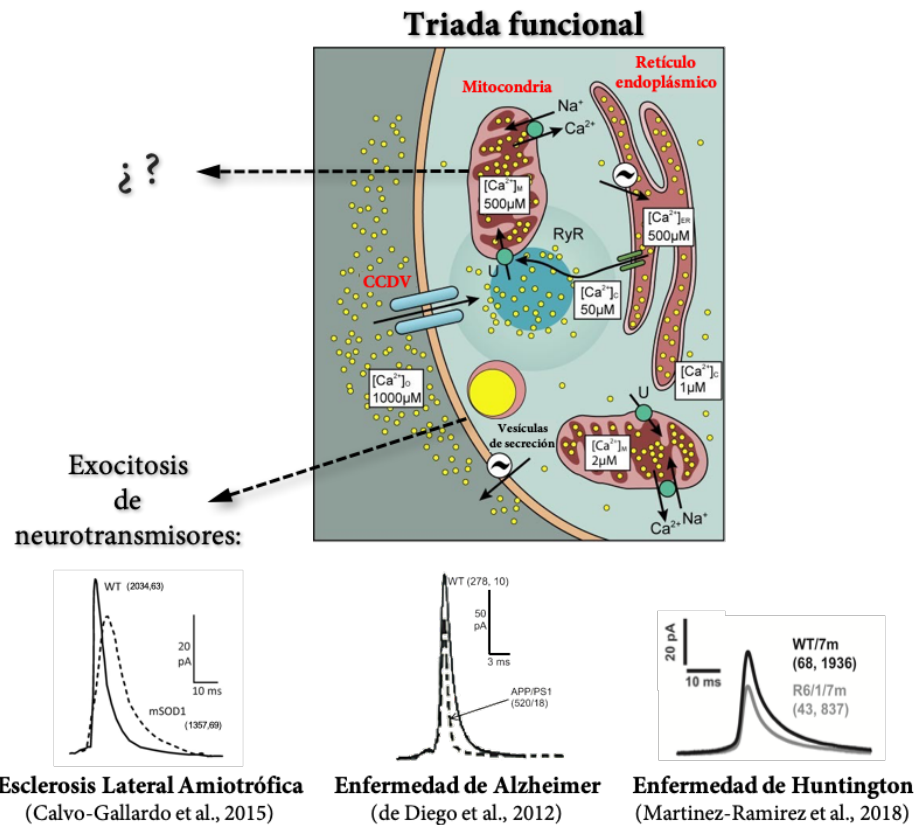


Figura 13. Esquema de la triada funcional formada por los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), la mitocondria y el retículo endoplásmico. Este sistema se organiza fisiológicamente para regular la dinámica del calcio intracelular y controlar diversos procesos celulares, como la liberación de neurotransmisores (ilustración modificada de García et al., 2006). Abajo, ejemplos de las espigas amperométricas obtenidas del análisis de la liberación de neurotransmisores en vesículas únicas, en la célula cromafin de distintos modelos murinos de enfermedades neurodegenerativas. Se puede comprobar que, en cada modelo de enfermedad, existe una alteración característica respecto a su control, que podría servir, de alguna manera, como un marcador específico de cada enfermedad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los trabajos previos de nuestro grupo de investigación tanto en ELA, como en enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Huntington, demuestran que la célula cromafín refleja cambios fisiopatológicos similares a los que se producen en sistema nervioso central de los pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Estos cambios podrían estar directamente relacionados con la patogénesis o ser secundarios a una posterior afectación del eje simpato-adrenal. Para la presente Tesis Doctoral nos planteamos la hipótesis de partida de que en el ratón SOD1^{G93A} modelo de ELA, existe una alteración de la célula cromafín primaria, pues creemos que se produce antes del desarrollo de la enfermedad. Esta alteración podría tener su origen en la mitocondria ya que se trata de un elemento central en la fisiopatología de la ELA, y su afectación podría explicar los cambios en la exocitosis, excitabilidad y dinámica del calcio observados en los trabajos realizados cuando la enfermedad ya estaba establecida. Con el propósito de responder a esta hipótesis, hemos desarrollado nuestro trabajo de investigación en base a al siguiente objetivo general y desarrollado en los objetivos específicos.

El **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral es realizar un estudio de ultraestructura y función mitocondrial en un modelo murino de ELA familiar, centrado en la célula cromafín del eje simpato-adrenal tanto en etapas presintomáticas como también cuando se establecen los síntomas de la enfermedad. Para ello, desarrollaremos los siguientes **objetivos específicos** en el ratón SOD1^{G93A} y en su control C57 a etapas presintomáticas y sintomáticas:

1. Estudiar la ultraestructura y la dinámica mitocondrial mediante microscopía electrónica de transmisión en tejido de médula adrenal.
2. Estudiar la función mitocondrial en cultivos de células cromafines a través del análisis del potencial de membrana.
3. Estudiar el perfil bioenergético celular en la célula cromafín.
4. Estudiar el nivel de estrés oxidativo celular a través de la medida global de radicales libres en cultivos de célula cromafín.
5. Estudiar la expresión de la proteína mutada que origina la enfermedad (hSOD1^{G93A}) en la médula adrenal.
6. Estudiar la relación de la enzima mutada hSOD1^{G93A} con la mitocondria.
7. Realizar un estudio bioquímico para determinar el estado de la apoptosis, el sistema de ubiquitinación de proteínas y la regulación de la dinámica mitocondrial a través de la proteína OPA1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. INSTRUMENTACIÓN Y EQUIPOS

Todos los equipos utilizados en las técnicas descritas en esta memoria se recogen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Relación de los equipos utilizados.

Técnica	Equipo	Modelo	Casa comercial
Cultivos celulares	Microscopio óptico	DMi1	Leica
	Campana de flujo laminar horizontal	IDL.96H	Indelab
	Incubador	INE 400	Memmert
	Baño	Precistern	P Selecta
	Microscopio estereoscópico	S6 E	Leica
Rotarod	ROTO-ROD series 8	ST-52790V	Stoelting
Microscopía confocal	Microscopio confocal	Espectral Leica TCS SP5 (SiDi, UAM)	Leica Microsystems
		ZEISS LSM 800 with Airyscan (UCLM)	Zeiss
Microscopía electrónica de transmisión	Microscopio electrónico de transmisión	JEM1010	JEOL
	Ultramicrotomo: Leica Ultracut S*		
	Cámara digital	Orius 200 SC	Gatan*
Microscopía electrónica de barrido	Microscopio electrónico de barrido	S-3000N	Hitachi
Microscopía de fluorescencia	Microscopio	DMI 4000 B	Leica Microsystems
	Objetivo inmersión	Leica ×40 Plan Apo; 1.25	Leica Microsystems
	Cámara	orca R2	Hamamatsu
	Fuente de luz	Küber CODIX xenon 8 lamp	Leica Microsystems
Cuantificación proteínas y western blot	Lector placas	FLUOstar optima	BMG Labtech
	Cámara revelado western blot	ChemiDoc™ MP	BioRad
		LAS-4000 Luminescent Image Analyzer	Fujifilm
	Centrífuga	MIKRO 200	Hettich*
	Sonicador	UP50H	Hielscher Ultrasonics GmbH
	Fuente eléctrica	PowerPac™ Basic Power Supply	BioRad
	Cubetas electroforesis	Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems	BioRad
	Transferencia semiseca	Trans-Blot® SD	BioRad
Genotipado	Termociclador	T-Personal 48	Biometra
	Transiluminador UV	Transilluminator M-20	UVP
	Termomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
	Centrífuga	Unicen 20	TQTech
	Bortex	Zx³	Velp® Scientifica
Bioenergética celular	Seahorse XFp Analyzer	XFp	Agilent

2. REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS

Todos los reactivos y productos químicos utilizados para llevar a cabo los experimentos recogidos en esta tesis se recogen en la **Tabla 3**, junto a su referencia y las casas comerciales que los suministraron.

Tabla 3. Relación de los reactivos químicos utilizados para todos los procedimientos experimentales.

Técnica	Reactivo	Referencia	Casa comercial
Cultivos celulares	DMEM	41965039	Gibco™
	Papaína	P4762	Sigma-Aldrich*
	Polilisina D	P1024	
	Penicilina/ Estreptomicina	P0781	
	Gentamicina	G1272	
	Suero Fetal Bovino (SFB)	F7524	
	Cubreobjetos 25 mm/ 12 mm		Menzel-Gläser
Inmunofluorescencia	Albúmina de suero bovino (BSA)	A4503	Sigma-Aldrich*
	Triton™ X-100	T8787	
	Suero de cabra		
	ProLong™ Gold Antifade Mountant	P36930	ThermoFisher scientific
	Paraformaldehído	P6148	Sigma-Aldrich*
	Anti-SOD1 humana	C4F6	Medimabs.
	MitoTracker™ Red CM-H2Xros	M7513	ThermoFisher scientific
Potencial de membrana mitocondrial	TMRE (tetrametil rodamina etil ester perclorato)	T669	Molecular Probes®
Estrés Oxidativo	CM-H ₂ DCFDA (6-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato, acetil ester)	C6827	ThermoFisher scientific
Cuantificación proteínas	Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay	786-571	G-Biosciences
	Albúmina de suero bovino (BSA)	A4503	Sigma-Aldrich*
	Inhibidores de proteasas SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free	S8820	
	Tampón de lisis: M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent	78501	ThermoFisher scientific
	Persulfato amónico	A3678	Sigma-Aldrich*
	Azul de bromofenol	B0126	
	Acrilamida 40%	1610148	BioRad
	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	T9281	Sigma-Aldrich*
	β-mercaptoetanol	M3148	
	dodecilsulfato de sodio (SDS)	L3771	
	Ponceau S solution	22001	Biotium
	Trizma® Base	T1503	Sigma-Aldrich*
	ECL Select® Western Blotting Detection Reagent	RPN2232	GE Healthcare, UK
	Amersham Protran 0.2 NC nitrocellulose	10600043	
Genotipado - PCR	REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit	XNAT-100RXN	Sigma-Aldrich*
	Agarosa	1620133	BioRad
	GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	41003	Biotium
	Marcador de peso molecular de proteínas	26619	Thermo scientific
	Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit	103010-100	Agilent technologies
Seahorse	Seahorse XFp FluxPak	103022-100	
	Seahorse XF Media & Calibrant	100840-000	
		102353-100	
Microscopía electrónica	Resina Araldite® (Durcupan™ ACM)	44610	Sigma-Aldrich*
	Acetato de uranilo	22400	Electron Microscopy Sciences

3. SOLUCIONES

Las soluciones utilizadas para realizar los experimentos que completan esta memoria se muestran resumidas en la **Tabla 4** junto a su composición y condiciones de almacenamiento.

Tabla 4. Relación de las soluciones utilizadas junto a sus condiciones de almacenamiento y notas para su elaboración.

Soluciones	Composición (en mM)	Almacenamiento
Locke	154 NaCl, 5,5 KCl, 3,6 NaHCO ₃ , 10 HEPES, y 5.5 D-glucosa (pH 7.4) penicilina 50 UI/ml, estreptomicina 50 µg/ml	4 °C
PBS	137 NaCl, 2,7 KCl, 10 Na ₂ HPO ₄ , 1,8 KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)	TA
Tyrode	137 NaCl, 2 CaCl ₂ , 5,3 KCl, 1 MgCl ₂ , 10 HEPES y 10 D-glucose (pH 7.4)	4 °C
PFA	4 gr paraformaldehído en 100ml PBS	4 °C
TAE	40 Tris Base, 20 ácido acético, 1 EDTA (pH 8)	TA
TBS	20 Tris y 150 NaCl	TA
TTBS	20 Tris, 150 NaCl y 0,1 % Tween 20	TA
Tris HCl 8.8 y Tris HCl 6,8	1500 Tris-HCl (pH 8.8) o 500 Tris-HCl (pH 6,8)	4 °C
SDS	10 % dodecilsulfato de sodio	TA
Tampón de carga electroforesis	Glicerol, 1 %Azul de bromofenol, SDS, β-mercaptoetanol	-20 °C
Tampón cacodilato 0,1 M	100 Cacodilato de sodio (pH 7,4)	TA
Tampón Sorensen fosfato 0,1M	133 Na ₂ HPO ₄ , 133 KH ₂ PO ₄ (pH 7,2), 320 mOsm	TA
Plomo Reynolds (1963)	1,33 g Pb(NO ₃) ₂ , 1,76 g Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇)H ₂ O, 0,32 g NaOH (en 50 ml H ₂ O)	4 °C

Todas las soluciones se diluyeron en agua ultrapura de calidad Milli-Q® obtenida con el sistema Milli-Q® Reference (Merckmillipore), esterilizada en el caso de las soluciones para cultivos celulares. (TA, temperatura ambiente).

4. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

La **Tabla 5** muestra los programas informáticos utilizadas para para el tratamiento y análisis de datos.

Tabla 5. Relación de los programas informáticos utilizados.

Programa	Versión	Compañía
GraphPad	6.01	GraphPad Software, Inc
ImageJ	1.52 i	NIH
ZEN	2.3 blue edition	Carl Zeiss Microscopy GmbH
LAS AF Lite	2.6.3	Leica Microsystems
LAS X	3.3.0.16799	Leica Microsystems
Microsoft Excel	Microsoft Office Professional Plus 2013	Microsoft
Adobe® Photoshop® CS5	12.0	Adobe
Quantity One	4.6.6	BioRad
Wave	2.6.0.31	Agilent Technologies

5. APROBACIÓN ÉTICA

Todos los protocolos experimentales realizados en el contexto de esta Tesis Doctoral, fueron aprobados por el comité de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y del Departamento de Medio Ambiente, administración local y ordenación territorial de la comunidad de Madrid (PROEX 227/15). La investigación se realizó de acuerdo al código ético y a las guías establecidas por la Directiva Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea (2010/63EU) y la legislación española (RD53/2013). Se hicieron todos los esfuerzos para evitar el sufrimiento animal y minimizar el número de animales utilizados.

6. ANIMALES

Se utilizaron ratones de la estirpe B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J) comúnmente denominados SOD1^{G93A}. Estos ratones sobreexpresan una mutación puntual en el gen del enzima SOD1 humana, debido a la sustitución de un aminoácido de glicina por uno de alanina en el codón 93 del cromosoma 12 (transgén realizado bajo el promotor humano). La colonia de ratones se inició gracias a una colaboración con el grupo del profesor Josep E. Esquerda Colell (Universitat de Lleida), que aportó al proyecto dos ratones macho transgénicos (heterocigóticos SOD1^{G93A}). A partir de estos ratones, iniciamos una colonia mediante su cruce con hembras silvestres de la cepa C57BL/6J provenientes del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Este cruce permitió mantener el transgén en un fondo genético C57BL/6. La descendencia se genotipó para seleccionar los ratones SOD1^{G93A} positivos como ratones transgénicos (SOD1) y los negativos como ratones silvestres control (C57). Los ratones fueron estabulados bajo condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C) y humedad relativa (60 ± 20 %), ciclos de luz/oscuridad de 12 h y comida y bebida *ad libitum*. Los experimentos se realizaron en ratones presintomáticos sacrificados entre los 30-45 días postnatales (P30) o en ratones sintomáticos, sacrificados entre los días 120-140 postnatales (P120) (**Figura 14**). Para extraer los tejidos, se realizó la eutanasia de los ratones por dislocación cervical tras anestesia por inhalación de CO₂.



Figura 14. Fotografía de dos ratones de la colonia SOD1^{G93A} utilizada para este estudio, tanto en etapa presintomática (P30) como sintomática (P120). En la imagen del ratón SOD1^{G93A} P120 se puede observar una parálisis avanzada del tren posterior.

7. GENOTIPADO Y MANTENIMIENTO DE LA COLONIA

La colonia de animales SOD1 se mantuvo en el animalario de la Facultad de Medicina de la UAM. Para ello, se cruzaron los ratones SOD1^{G93A} positivos con hembras silvestres de la cepa C57BL/6J que servían de hembras reproductoras durante un año (± 3 partos). La descendencia se destetó al mes de su nacimiento, se sexó para descartar las hembras, se marcaron los machos y se genotiparon mediante una reacción de polimerasa en cadena (PCR). Los ratones macho SOD1^{G93A} positivos se utilizaron bien para los experimentos a edad P30, bien como reproductores para sucesivas camadas, o bien para los experimentos a edad P120. Los ratones macho SOD1^{G93A} negativos, fueron utilizados como control C57 en cada experimento. Se intentó mantener constantemente 2 ratones macho SOD1^{G93A} reproductores con 2 hembras C57BL/6J por cada uno de ellos, que se iban sustituyendo a medida que se detectaba que estaban preñadas. La ventana reproductora de estos ratones fue muy pequeña, dada la temprana edad a la que inician los síntomas, siendo efectivos como reproductores desde P60 a P110.

Para el genotipado de los ratones, el ADN se extrajo del tejido que se obtuvo en el proceso de marcaje de los ratones en la oreja. Para esta técnica, utilizamos el kit “REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR”, siguiendo el siguiente protocolo:

a) Extracción de ADN: Se añadió 45 μ l de una mezcla de los reactivos del kit “solución de extracción” y “solución de preparación de tejido” (4:1) a cada eppendorf de 1.5ml que contenía el tejido. Se agitó mediante vórtex, se dejaron 10 min a temperatura ambiente, se calentaron 3 min en un termobloque a 95 °C y finalmente se añadió a cada muestra 45 μ l del reactivo “neutralizador”. Se recogieron 80 μ l del sobrenadante que se congeló a -80 °C para realizar la PCR en el momento necesario.

b) Amplificación de ADN: Para la PCR, se preparó una solución con las siguientes proporciones por cada muestra a genotipar, que contiene los cebadores (0,4 μ M) y un reactivo con una mezcla de los elementos necesarios para la reacción (**Tabla 6**), que son: medio tampón, sales, deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), la enzima Taq Polimerasa y la sonda REDTaq. Como cebadores de los genes a amplificar se usaron: dos para el gen mutado, que amplifican 236 pares de bases; y dos para el gen de la interleucina 2 (IL-2), que amplifica 324 pares de bases y se utilizó como gen control.

Tabla 6. Resumen del contenido del reactivo para amplificar el ADN de las muestras de los ratones y secuencia de nucleótidos de los cebadores directo (D) y reverso (R) para *hSOD1^{G93A}* e IL-2.

Cebador	x1
H ₂ O destilada	1,55 μ l
Cebador para <i>hSOD1^{G93A}</i> (D) 5' CATCAGCCCTAATCCATCTGA 3'	0,2 μ l
Cebador para <i>hSOD1^{G93A}</i> (R) 5' CGCGACTAACAAATCAAAGTGA 3'	0,2 μ l
Cebador para IL-2 (D) 5' CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT 3'	0,52 μ l
Cebador para IL-2 (R) 5' GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC 3'	0,52 μ l
REDExtract-N-Amp PCR ReadyMix	5 μ l

Para cada muestra se utilizaron 8 μ l de esta solución y se añadió 2 μ l del ADN extraído en el paso anterior. Además, en cada genotipado se utilizaron tres muestras de controles: una con ADN de un ratón *SOD1^{G93A}* positivo, una con ADN de un ratón *SOD1^{G93A}* negativo y una muestra sin ADN para ver que no se amplificaba nada (en este caso solo se puede observar el frente de la PCR con los cebadores, pero ninguna banda). Las muestras se procesaron en el termociclador donde se realizó el siguiente programa (**Tabla 7**) para amplificar el ADN:

Tabla 7. Protocolo de termociclador para la amplificación de las muestras de ADN.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Ciclos
Desnaturalización	95	180	1
Desnaturalización	95	30	35
Hibridación	60	30	
Extensión	72	45	
Extensión final	72	60	1
Final	4	∞	1

c) Electroforesis: Una vez finalizada la PCR, se preparó un gel de agarosa al 1,5%. Para ello se pesó 1,8 gr de agarosa que se diluyó en 120 ml de solución de electroforesis (TAE), calentándolo en microondas para conseguir la solubilidad de la agarosa. Una vez disuelta, se añadió 12 μ l de GelRed® Nucleic Acid Gel Stain para poder detectar el ADN mediante su exposición a luz ultravioleta. Tras 45 minutos para permitir la total gelificación, se cargaron las muestras de la PCR en los pocillos cercanos al polo negativo, ya que el ADN migrará hacia

el polo positivo debido a sus cargas negativas. Se realizó la electroforesis a 100 V durante 1 h 30 min aproximadamente, hasta conseguir una buena separación de las bandas del gen control y del gen mutado. En el primer pocillo, siempre se cargó 4 µl de marcador de pares de bases.

Se utilizó una lámpara UV para revelar las bandas de ADN amplificado y realizar una fotografía del gel en el que identificamos si los ratones eran transgénicos.

8. ROTAROD

La evaluación de la función locomotora de los animales se realizó mediante la prueba del rotarod. Para esta prueba, los ratones se colocan encima de unos cilindros suspendidos a una pequeña altura del suelo que giran sobre su eje central por lo que los ratones se ven obligados a andar para intentar no caer. Se programó una velocidad inicial de 8 rpm, que se incrementaba cada 8 s 1 rpm hasta un tiempo máximo de 2 minutos. Se analizó el tiempo de permanencia en el cilindro giratorio para cada ratón, realizando 10 pruebas consecutivas. Se permitió que los ratones completasen una vuelta agarrados al cilindro, pero en caso de una segunda vuelta se dio por finalizada la prueba. Los ratones fueron entrenados el día previo a la prueba, para familiarizarse con el aparato y el protocolo. Se utilizó un mínimo de 4 animales por grupo.

9. CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN

Las glándulas adrenales fueron aisladas del animal bajo condiciones estériles, tras una escisión abdominal y su posterior localización entre la grasa que encuentra en la parte superior del riñón. Bajo una lupa estereoscópica, con la ayuda de pinzas y una hoja de bisturí, se eliminó la grasa, la cápsula, y la corteza, para diseccionar la médula adrenal y limpiarla lo máximo posible. La médula adrenal se introdujo en un tubo eppendorf de 200 µL con una solución enzimática de papaína a una actividad 25 U/ml (disuelta en solución Locke) durante 20 minutos a 37 °C, para conseguir una primera digestión enzimática del tejido. Trabajando en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, esta solución se cambió por 1ml de medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con un 8 % de suero fetal bovino (SFB), haciendo de esta manera 3 lavados sucesivos de las glándulas sucesivos y conseguir así la eliminación e inactivación de la papaína. Dejamos las glándulas en un volumen final de 100 µL de medio DMEM de cultivo y se realizó una digestión mecánica del tejido mediante el paso sucesivo y cuidadoso de las glándulas por puntas de pipeta (empezando con una pipeta de 1ml, luego una de 200 µL y finalmente una de 10 µL), evitando generar burbujas. Se sembraron

gotas de 10 μL de la solución con la suspensión celular conseguida en cubreobjetos de 25 mm ó 12 mm, para placas de 6, 24 ó 48 pocillos. Estos cubreobjetos fueron previamente esterilizados durante 30 min con lámpara UV, pretratados con polilisina D (durante 45 min en incubador) y lavados con agua destilada estéril. Tras 30 minutos en el incubador para permitir a las células adherirse al cubreobjetos, se añadieron 2 ml de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 4 %, penicilina/estreptomicina (50 UI/ml y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente) y gentamicina (0,5 mg/l) a cada pocillo. Las células cromafines se cultivaron sin cambiar el medio de cultivo ya que los experimentos se realizaron en un período de 1-2 días tras su cultivo (**Figura 15**). Las condiciones del incubador fueron las condiciones estándar para cultivos celulares: temperatura de 37 °C, saturación de humedad al 90 % y atmósfera constante de 95 % aire y 5 % CO_2 .

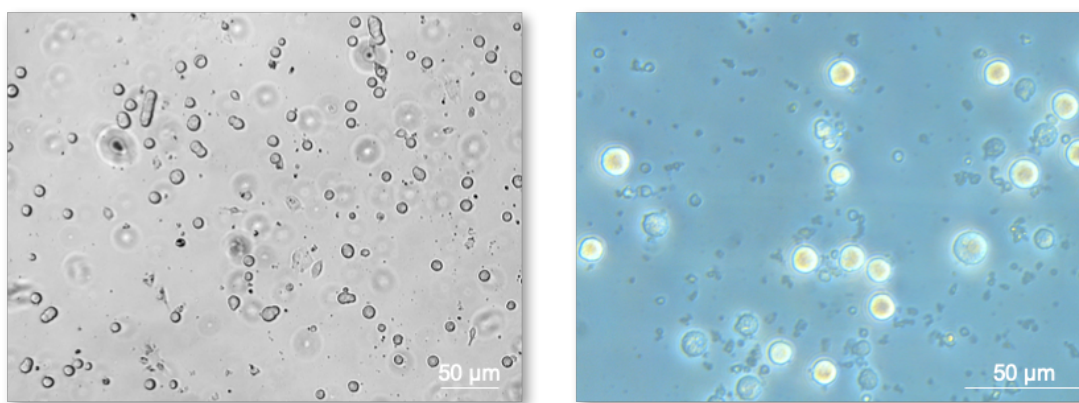


Figura 15. Imágenes de cultivo de célula cromafín de ratón a las 24 h de cultivo, adquiridas con un microscopio óptico.

10. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)

El microscopio electrónico de transmisión es un instrumento que permite obtener imágenes de muestras finas a alta resolución (~ 2 nm). Esto lo consigue gracias a la proyección de un haz de electrones acelerados por una fuente de alto voltaje (~ 100 kV) en una cámara de vacío, que son dirigidos hacia una muestra gracias a unas lentes magnéticas generadas con electroimanes. La muestra debe ser un corte fino que se procesa con técnicas de fijación y tinción con metales pesados (ej. sales de osmio). Estos metales se unen a determinadas estructuras como las membranas celulares y provocan que los electrones proyectados se paren, se desvíen o atraviesen la muestra. Los electrones son reconducidos con lentes magnéticas a modo de objetivo generando una imagen ampliada que puede ser registrada.

Protocolo experimental

Para el estudio ultraestructural de la mitocondria por microscopía electrónica se utilizó un total de 3 animales de cada grupo. Las dos glándulas adrenales de los 3 ratones C57 y SOD1 a ambas edades (P30 y P120) se diseccionaron y se fijaron por inmersión en 4 % paraformaldehído (PFA) y 1 % glutaraldehído en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7.4) durante 8 h a 4 °C. Tras la fijación de las glándulas adrenales, bloques coroneales del tejido de cada glándula adrenal se trataron con tetraóxido de osmio al 1 % acuoso durante 1,5 h de postfijación a 4 °C, para dar contraste. Posteriormente las muestras se deshidrataron mediante el pase sucesivo por soluciones hidroalcohólicas a concentraciones de 30, 50, 70, 95 % v/v (10 min en cada paso), alcohol absoluto (dos veces durante 10 minutos), acetona (dos veces durante 5 minutos). Finalmente se incluyeron en resina Araldite® (Durcupan™ ACM) para realizar los cortes. Mediante un ultramicrotomo, se cortaron secciones de 600 nm y se montaron en rejillas de 200 mallas donde fueron tratadas con acetato de uranilo y citrato de plomo para dar contraste. Las micrografías se realizaron en el servicio de microscopía del SIdI (Servicio Interdepartamental de Investigación) de la UAM, con un microscopio electrónico de transmisión JEOL, a una tensión de 80 kV, utilizando una cámara digital para la adquisición de las imágenes. Las fotografías de células enteras se realizaron a un aumento de 5000x mientras que las imágenes de mitocondrias se realizaron a 40000x.

Análisis ultraestructural de la mitocondria

El análisis del área de la matriz y de las crestas de las mitocondrias se hizo con el programa ImageJ, realizando los cálculos que se muestran en la **Tabla 8**. Se seleccionaron las fotos realizadas a 40.000 aumentos en las que mejor se distinguían las membranas de la mitocondria: membrana mitocondrial externa (MME), membrana mitocondrial interna (MMI) y crestas mitocondriales. Tras el calibrado de la foto ($1\mu\text{m} = 472$ píxeles a la resolución adquirida de 1024×1024 píxeles y el aumento 40000x), se utilizó la herramienta “dibujo a mano alzada” para seleccionar las membranas y se midió el parámetro de área con la herramienta de gestión de regiones de interés (ROI manager).

Tabla 8. Cálculos realizados en el estudio morfométrico mitocondrial.

Medida	Cálculo
Área mitocondria	= área de MME
Densidad mitocondria	= número de mitocondrias / área célula
Área crestas	= sumatorio de área de las crestas
Densidad de crestas	= número crestas / área mitocondria
% crestas	= área crestas / área mitocondria x 100

11. INMUNO-ORO

Se realizó un protocolo estándar de tinción inmuno-oro para revelar la localización subcelular de SOD-1G93A. Se cortaron secciones de 6 nm de las medulas adrenales introducidas en la tinción utilizando el microtomo, y se recogieron en rejillas de níquel. Las secciones ultrafinas fueron embebidas en 0,1 M de HCL durante 5 minutos, lavadas tres veces durante otros 5 min cada una en TBS (20 mM TRIS, 140 mM NaCl, and 2.7 mM KCl, pH 8.0) y a continuación, fueron tratadas con una solución tampón de bloqueo (0.1 % gelatina, 1 % suero de cabra, y 0.3 % Triton X-100 en TBS) durante 30 minutos. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario Anti hSOD1^{G93A} (1:500) durante 2 horas a temperatura ambiente, luego se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada una en TBS. En ese momento, se introdujo el anticuerpo secundario conjugado con oro (Anti-Mouse IgG 10-nm gold) durante 1 hora, se lavó 3 veces en TBS, y después en agua teñida con citrato de plomo Reynolds seguido de acetato de uranilo acuoso al 2 %, finalmente se secaron en papel de filtro.

Análisis inmuno-oro

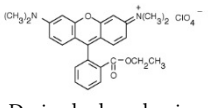
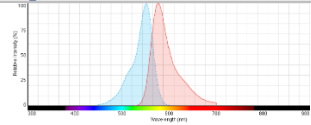
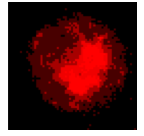
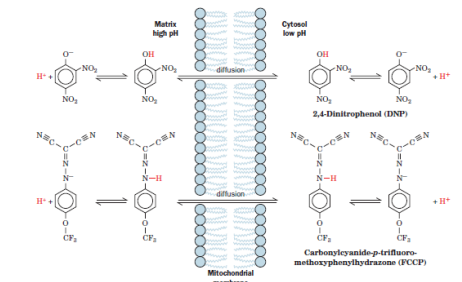
Para el análisis de la localización de las partículas de SOD1^{G93A} y su cuantificación se utilizó el software ImageJ, mediante dos procedimientos diferentes. En el caso del análisis de las partículas de citosol, las imágenes se dividieron en 100 cuadrantes iguales de los cuales se seleccionaron 10 aleatoriamente, A3, B5, B8, D2, D6, E4, F9, G3, H8 e I5. En estas imágenes se midieron las áreas de citosol y el tamaño de las partículas de oro, conociendo que las partículas son de un tamaño de 0,5 μm de radio, lo que corresponde a un área de $7,85 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2$. Esta medida nos permite comparar los agregados y discernir si se trataba de una partícula de SOD1^{G93A}, ribosomas o partículas de osmio que precipitaron durante los procesos de fijación celular. Para el análisis de las partículas en las mitocondrias, se analizaron 134 mitocondrias en las que se identificaron las partículas halladas en matriz, áreas de membrana y en las crestas. Además se determinó el área total de las mitocondrias. Los cálculos de densidad se realizaron utilizando el software Excel.

12. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (Ψm)

Para el estudio de potencial de membrana mitocondrial, se utilizó la sonda catiónica fluorescente tetrametil rodamina etil éster perclorato (TMRE). Esta sonda es una molécula que presenta una libre difusión en membranas celulares y que se introduce en la célula gracias a su

potencial eléctrico negativo (≈ -60 mV) acumulándose en la mitocondria dado su mayor electronegatividad (≈ -140 mV), como se puede apreciar en la **Tabla 9**. Por lo tanto, el potencial de membrana mitocondrial se puede determinar en función de la compartimentalización de la sonda en la mitocondria, que es directamente proporcional al gradiente eléctrico de la organela. El protocolo consiste en monitorizar la fluorescencia de las mitocondrias bajo condiciones estandarizadas de incubación de la sonda, y provocar así su despolarización total, analizando posteriormente la pérdida de fluorescencia que se produce.

Tabla 9. Sondas y fármacos para la medida del potencial de membrana mitocondrial.

Sonda	Estructura	Espectro de excitación/emisión	Ejemplo en célula
TMRE Tetrametil rodamina etil ester perclorato	 Derivado de rodamina	 Ex 549 nm / Em 574 nm	
Fármaco	Mecanismo de acción		
FCCP Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone	 Disipa el potencial de membrana mitocondrial introduciendo iones H^+ desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial		

Protocolo experimental

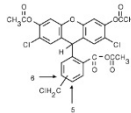
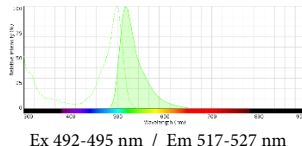
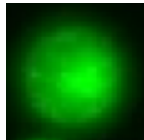
Los cultivos de células cromafines se incubaron durante 5 minutos con una solución Tyrode 25 nM TMRE en la misma placa de 6 pocillos en la que fueron sembrados, retirando el medio de cultivo y añadiendo 1 ml de la solución con la sonda fluorescente en el pocillo que se iba a utilizar. Tras este período de incubación, el cubreobjetos con las células se montó en una cámara soporte de metacrilato para poder colocar el cubreobjetos con las células en el microscopio de fluorescencia. Al soporte con el cubreobjetos se le añadieron 2 ml de medio Tyrode con 25 nM de TMRE para mantener el equilibrio de reparto de la sonda durante todo el experimento. Este aspecto es crítico debido a su libre difusión por membranas. Se montó en el microscopio y se acopló una bomba de perfusión de 5 vías controlada electrónicamente por electroválvulas para perfundir la solución Tyrode con 25 nM de TMRE nueva, o la solución con el despolarizante mitocondrial FCCP (3 μ M), disuelto en Tyrode con 25 nM TMRE. Las imágenes se adquirieron a intervalos de 2 s para evitar el blanqueo de la sonda fluorescente, utilizando un filtro de excitación de 545 ± 30 nm y un filtro de emisión a 610 ± 30 nm. Tras 30

seg de registro basal, se perfundió sobre las células la solución de FCCP durante otros 30 seg para despolarizar las mitocondrias, lo que derivó en una pérdida de la fluorescencia, ya que la sonda catiónica sale desde el interior de la mitocondria hacia el citosol. Finalmente, se lavaron las células con solución control durante 1 min para permitir la repolarización de las mitocondrias y la recuperación de la fluorescencia. Mediante el programa LAS AF, se seleccionaron como áreas de interés las zonas más intensas en cada célula que correspondían a la masa mitocondrial, y se analizó la evolución de la fluorescencia en esa región durante todo el experimento.

13. ESTUDIO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

La generación de especies reactivas de oxígeno en los cultivos de células cromafines de ratones C57 y SOD1^{G93A} se estudió en condiciones basales durante un período de 30 minutos, sin ningún tipo de estímulo. Para ello se realizó un estudio de fluorescencia utilizando la sonda sensible a radicales libres CM-H₂DCFDA (**Tabla 10**). Esta sonda es una forma reducida de la molécula de fluoresceína, susceptible de ser oxidada en el ambiente celular. Su oxidación produce un aumento de fluorescencia que puede ser detectado y cuantificado, correlacionando así su fluorescencia con la cantidad de especies reactivas de oxígeno presentes en la célula. La sonda es muy sensible a la foto-oxidación por lo que hay que trabajar en rigurosas condiciones de oscuridad (luz de sodio) y evitar exponer mucho las células bajo la luz del microscopio durante el enfoque de la muestra.

Tabla 10. Sonda para la determinación de la generación de ROS.

Sonda	Estructura	Espectro de excitación/emisión	Ejemplo en célula
CM-H₂DCFDA 6-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester	 Derivado clorometílico de H ₂ DCFDA	 Ex 492-495 nm / Em 517-527 nm	

Protocolo experimental

Los cultivos de células cromafines se incubaron durante 30 minutos en medio DMEM con la sonda CM-H₂DCFDA a una concentración final de 25 μ M, en la misma placa de 6 pocillos en la que fueron sembrados. Se retiró el medio de cultivo y se añadió 1ml de la solución con la sonda fluorescente (disuelta en DMEM) en el pocillo que se iba a utilizar, dejando la

placa los 30 minutos en el incubador (37 °C, saturado de agua y 5 % CO₂). Se montó el cubreobjetos con las células en la cámara de metacrilato para llevar al microscopio bañadas en solución Locke. Una vez enfocadas las células, se inició la monitorización de la fluorescencia, realizando fotos con una frecuencia de 1 minuto y utilizando un filtro de excitación de 472 ± 30 nm y un filtro de emisión de 520 ± 35 nm.

Para el posterior análisis de las imágenes, se seleccionó cada célula cromafín con un área de interés circular ajustada al tamaño de la célula usando el programa LAS AF y se monitorizó la intensidad media de fluorescencia durante todo el experimento en cada célula individual.

14. ESTUDIO DE LA BIOENERGÉTICA CELULAR

Para el estudio de la bioenergética de la célula cromafín y comprobar el estado funcional de las mitocondrias, se utilizó el analizador celular Seahorse XFp, con el que se realizó un test de estrés mitocondrial (Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit). El equipo Seahorse permite realizar, en cultivos celulares, la medida simultánea del ratio de consumo de oxígeno (OCR, que indica la respiración mitocondrial) y de la acidificación extracelular (que se produce principalmente como resultado de la glucólisis). El kit utilizado consiste en la administración de 4 fármacos (**Tabla 11**) que actúan en distintos elementos de la cadena de transporte electrónico o en la mitocondria durante la medición del OCR en el cultivo. De esta manera se modifica la función mitocondrial y mediante cálculos del consumo de oxígeno en cada situación, podemos sustraer información como: la respiración basal, la respiración acoplada a la producción de ATP, las capacidades máximas y las de reserva y respiración no mitocondrial (**Tabla 12**).

Tabla 11. *Fármacos utilizados para modular la función mitocondrial.*

Fármaco	Mecanismo de acción
Oligomicina	Bloquea el complejo V (F ₁ F ₀ -ATP sintasa) de la cadena de transporte electrónico.
FCCP	Produce la despolarización mitocondrial por alteración del equilibrio de protones.
Rotenona	Bloquea el complejo I de la cadena de transporte electrónico.
Antimicina A	Bloquea el complejo III de la cadena de transporte electrónico.

Tabla 12. Cálculos para sustraer los parámetros del perfil bioenergético a partir del OCR

Parámetro	Fórmula de cálculo
Respiración basal	Medida anterior a la primera inyección – Respiración no mitocondrial
Fuga de protones	Medida tras inyección de oligomicina – Respiración no mitocondrial
Respiración máxima	Medida tras inyección de FCCP – Respiración no mitocondrial
Capacidad de reserva respiratoria	Respiración máxima – Respiración Basal
Consumo de oxígeno no mitocondrial	Medida tras la inyección de rotenona/antimicina A
Producción de ATP	Medida antes de la inyección de oligomicina – Medida tras la inyección de oligomicina
Eficiencia de acoplamiento (%)	Producción de ATP / Respiración basal x 100
Capacidad respiración de reserva (%)	Respiración máxima / Respiración basal x 100

Grafica de OCR	Diana farmacológica
<p>Test de estrés mitocondrial</p>	

Protocolo experimental

Se hicieron cultivos primarios de células cromafines del mismo modo que el explicado anteriormente, pero sembradas por duplicado en las placas del equipo Seahorse (XFp CellCulture miniplates). En las placas de 8 pocillos, el primer pocillo y el último se utilizaron como blancos, los pocillos 1-3 se utilizaron para 3 cultivos control (de 3 ratones distintos) y los pocillos 4-7 para 3 cultivos SOD1^{G93A}. Las placas se pretrataron con polilisina-D y el volumen final para los cultivos fue de 180 µl (medio DMEM). En los laterales de la placa se añadieron 200 µl de tampón Seahorse para evitar la evaporación del medio de cultivo y se incubaron durante 24 h en condiciones estándar (37 °C, 5 % CO₂ y saturación de humedad). El cartucho de calibración se dejó humectando los sensores con 400 µl de Agilent Seahorse XF Calibrant en los pocillos laterales y 180 µl en los pocillos centrales, dentro de una caja húmeda en una estufa a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se preparó el medio de ensayo suplementando al medio Agilent Seahorse XF Base Medium con glutamina (2 mM), piruvato (1 mM) y glucosa (10 mM). Se aclimataron las células cambiando el medio de cultivo por el medio de ensayo preparado y se dejó la placa en la cámara húmeda de la estufa a 37 °C durante 1 hora. También se añadió el mismo volumen de este medio en los pocillos 1 y 8 (blanco).

Durante la aclimatación, se prepararon las soluciones madre de los fármacos del kit: oligomicina (50 μM), FCCP (50 μM) y rotenona/antimicina A (25 μM), y se diluyeron siguiendo los cálculos del fabricante para conseguir una concentración final de 1 μM en el caso de la oligomicina y el FCCP, y de 0.5 μM en el caso de la rotenona/antimicina A. Los cartuchos se cargaron con los fármacos en los puertos A (oligomicina), B (FCCP) y C (rotenona/antimicina A), dejando el puerto D libre. Se inició el programa en el analizador, y tras 15 minutos de estabilización y calibración de los cartuchos se introdujo la placa del cultivo celular para iniciar las medidas.

15. INMUNOFLUORESCENCIA EN CÉLULAS

En la técnica de inmunofluorescencia se emplea un anticuerpo unido a un fluorocromo que permite la detección, localización y cuantificación de un antígeno (generalmente una proteína o un polisacárido) a través de un microscopio de fluorescencia. Para ello es necesario realizar la fijación de la muestra para preservar la localización, composición y estructura del material biológico a analizar, para mantener la situación que existe *in vivo* lo más fielmente posible. Luego se permeabiliza con detergentes no iónicos para producir poros en las membranas celulares que permitan el paso de los anticuerpos. Mediante el uso de una solución proteica concentrada se bloquea el tejido para minimizar interacciones inespecíficas de los anticuerpos, ya que una vez bloqueado nuestro tejido, el anticuerpo primario debe competir con la proteína bloqueante para unirse a su epítipo. De forma similar, también se pueden utilizar toxinas o moléculas con propiedades fluorescentes que permiten marcar de manera específica determinadas estructuras como las mitocondrias, el núcleo, o el citoesqueleto.

Para su detección, es necesario un microscopio fluorescente que revela y forma una imagen del fluorocromo aprovechando sus propiedades fluorescentes. Esto se consigue mediante la excitación de la molécula a una determinada energía (longitud de onda), que provoca la promoción de electrones a orbitales de mayor energía. Éstos, al volver al estado basal emiten fotones de menor energía (mayor longitud de onda) que los recibidos durante la excitación, puesto que parte de ellos se perdieron en el estado excitado. Este proceso se ilustra en el diagrama de Jablonski, donde el desplazamiento hacia la derecha en el espectro electromagnético que se producen entre la longitud de onda de excitación y emisión se denomina “*Stokes shift*” (**Figura 16**). Mediante el uso de filtros o láseres, podemos seleccionar las longitudes de onda específica para excitar la muestra y para detectar su emisión de luz. Esto

aporta versatilidad a la técnica al permitir combinar varios fluorocromos de diferentes longitudes de onda de excitación o emisión, y observarlos de manera individual en la misma muestra.

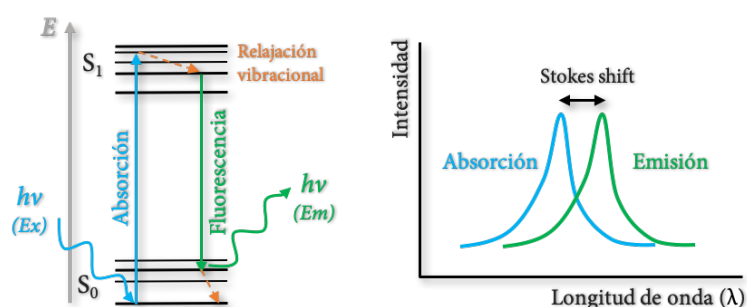


Figura 16. Esquema energético del fenómeno de fluorescencia y desplazamiento de la longitud de onda del espectro de absorción y de emisión debido a la pérdida de energía (Stokes shift).

Para cada estudio de inmunofluorescencia realizado en este trabajo de investigación, se realizó un procedimiento específico en función del anticuerpo primario, el orgánulo a estudiar, o el tipo de experimento (células cultivadas *in vitro* o fijadas). A continuación, se describe el protocolo estándar utilizado, y al final se resume en la **Tabla 13** las peculiaridades para cada uno (referencia de los anticuerpos/sondas fluorescentes, tiempos y condiciones de incubación, medios utilizados y anticuerpos secundarios utilizados).

Tabla 13. Resumen de anticuerpos y sondas utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia, con las condiciones de utilización.

Inmuno	Ac 1º sonda	[]	Fijación	Incubación	Medio de dilución	Ac 2º	Filtros
hSOD1 ^{G93A}	Anti SOD1 humana (C4F6)	1:500	Si	Una noche, 4 °C	PBS, 1% Suero	Alexa Fluor 488 cabra anti ratón (1:1000)	Ex 472 ± 30 nm Em 520 ± 35 nm
Mitocondria	MitoTracker™ Red CM-H2Xros	500 nM	No	45 min, incubador celular	PBS	-	Ex 560 ± 40 nm Em 645 ± 30 nm
Citoesqueleto	Faloidina	5:200	Si	45 min, TA, oscuridad	PBS	-	Ex 560 ± 40 nm Em 645 ± 30 nm
Núcleos	DAPI	1 µg/ml (1:5000)	Si	15 minutos, TA, oscuridad	PBS	-	Ex 360 ± 40 nm Em 470 ± 40 nm

Protocolo experimental

a) Fijación: Los cultivos celulares se lavaron una vez en la placa de cultivo con solución PBS esterilizada y filtrada, a 37 °C. Se retiró el PBS y se añadió una solución de paraformaldehído al 4 %, temperada a 37 °C durante 20 minutos y en cantidad suficiente como para cubrir todo el fondo del pocillo.

b) Permeabilización y bloqueo: El PFA se descartó y se lavó el cultivo dos veces con la solución PBS. Posteriormente se realizó la permeabilización y bloqueo de las células con una solución de PBS con 0,1 %, Triton X-100 y 5 % de suero, durante 1 h a temperatura ambiente. El origen animal del suero de bloqueo se intentó hacer coincidir con el animal en el que estaba generado el anticuerpo secundario que se utilizó en cada experimento.

c) Inmunodetección: Se retiró el medio de permeabilización y bloqueo y las muestras se incubaron durante una noche a 4 °C con el anticuerpo primario (a la concentración descrita en la tabla siguiente) en PBS que contiene un 1 % suero. A las 24 h se retiró el medio con el anticuerpo primario, y se lavó dos veces el pocillo con solución PBS. Se añadió el anticuerpo secundario disuelto en PBS con 1 % suero y se incubó a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad durante 1 h. Finalmente, se retiró la solución de anticuerpo secundario, se lavó 2 veces cada pocillo con PBS y se marcaron los núcleos celulares con una solución PBS con 1 µg/ml de DAPI durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Las preparaciones de inmunofluorescencia se montaron sobre portaobjetos con 4 µl de medio líquido de montaje ProLong® Gold Antifade y se dejaron secar antes de observarlas en el microscopio para evitar el movimiento de las preparaciones.

Análisis de colocalización

Para analizar la colocalización de la señal verde de la proteína mutada y la roja de la mitocondria, se abrieron con el programa ImageJ las imágenes del canal verde y rojo por separado, se les aplicó el mismo límite (*threshold*) a todas las fotos que se definió en función de la señal media obtenida en todas las fotos a analizar, para optimizar la selección de la señal. Se creó una selección para cada señal y se cuantificó su área. Se generó una selección del área de solapamiento entre las dos señales, definida como área de colocalización y que se normalizó al área de mitocondria (señal roja) para cada imagen.

16. WESTERN BLOT

Los estudios bioquímicos de expresión tisular de la proteína humana mutada SOD1 (hSOD1^{G93A}), la proteína implicada en la dinámica mitocondrial OPA1, la proteína proapoptótica Bax y las proteínas mono y poliubiquitinadas, se realizaron mediante la técnica de western blot.

Para cada proteína y cada anticuerpo, se optimizó el protocolo en cuanto a concentraciones, porcentajes de gel o tiempos de las incubaciones hasta encontrar los mejores parámetros que permitiesen analizar la expresión proteica. El protocolo estándar utilizado en esta investigación se resume a continuación y las condiciones especiales para cada proteína o anticuerpo, así como su referencia y características quedan resumidos en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Resumen anticuerpos utilizados en los experimentos de western blot, con sus condiciones de utilización.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Ac 1°	Referencia	Origen	Tipo	[]	Incubación	Medio de dilución	Ac 2°
hSOD1 ^{G93A}	18	Misfolded Human SOD1 antibody (C4F6)	Médimabs #MM-0070-2-P	Ratón	Monoclonal (IgG2a)	1: 500	Overnight, 4 °C	TTBS 5 % Leche	HRP anti-ratón (1:5000)
OPA1	80 – 100	OPA1 (D6U6N) Rabbit mAb	Cell Signalling #80471	Conejo	Monoclonal	1: 1000	Overnight, 4 °C	TTBS 5 % Leche	HRP anti-conejo (1:5000)
Bax	20	Bax antibody	Cell Signalling #2772	Conejo	Policlonal	1: 1000	Overnight, 4 °C	TTBS 5 % Leche	HRP anti-conejo (1:5000)
β-actina	42-45	Monoclonal Anti-β-Actin–Peroxidase clone AC-15	Sigma-Aldrich A3854	AC-15 hybridoma	Monoclonal (IgG1)	1: 50000	45 minutos, temperatura ambiente	TTBS 5 % Leche	-
FK2	-	Anti-Ubiquitinated proteins Antibody, clone FK2	Merkmillipore 04-263	Ratón	Monoclonal (IgG1)	1: 1000	Overnight, 4 °C	TTBS 5 % Leche	HRP anti-ratón (1:5000)

Protocolo experimental

a) Extracción y cuantificación de proteínas: Las médulas adrenales previamente disecadas y congeladas a -80 °C se homogenizaron en 60 µl de solución de extracción M-PER® *Mammalian Protein Extraction Reagent* suplementado con el inhibidor de proteasas. Al tratarse de un tejido de tan pequeño tamaño, se homogeneizó mediante pulsos de ultrasonidos en ciclos intercalados con enfriamiento de los eppendorf en un baño de agua-hielo para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. Tras homogeneizar el tejido, se dejó la solución en agitación sobre hielo durante 20 min y se centrifugó durante 20 min a 13.000 rpm y 4 °C. El sobrenadante con las proteínas extraídas, se cuantificó utilizando el ensayo Bicinchoninic Acid Protein Assay (BCA) utilizando como recta patrón un estándar de la proteína albúmina de suero bovino (BSA). Las muestras de proteínas cuantificadas, se diluyeron en solución de extracción para conseguir una solución final a una concentración 3 µg/µl y así cargar en cada pocillo del gel de transferencia siempre 10 µl (lo que corresponde a 30 µg de proteína por carril). Esta solución se congeló a -20 °C para su conservación entre cada uso.

b) Separación de proteínas por electroforesis: Se prepararon los geles al 12 % de acrilamida (habitualmente se prepararon el día anterior y se dejaron los cristales con los geles en nevera). Posteriormente, se descongelaron las soluciones con muestra de proteína, se les

añadió el tampón de carga (1:6) y se calentaron a 95 °C durante 5 min en agitación (800 rpm). Se cargó en el primer pocillo del gel el marcador de pesos moleculares (4 µl) y seguidamente los 10 µl de las muestras de proteína. Se realizó la electroforesis en una cubeta Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems con una fuente de alimentación PowerPac™ Basic Power Supply (BioRad) a 90 V durante 10 min para generar el frente uniforme de la electroforesis en el gel de empaquetamiento y luego a 120 V durante 2 h aproximadamente (evitando siempre que se escape el frente).

c) Transferencia de proteínas: Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante una transferencia semiseca con un equipo Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) durante 1 h 30 min a 18 V. Finalizada la transferencia, se realizó una tinción de *Ponceau* de las membranas para monitorizar la correcta transferencia de las proteínas en todos los pocillos y para facilitar el corte de las membranas en caso necesario. Se lavaron las membranas en solución TTBS hasta eliminar todo el colorante rojo.

d) Ensayo de inmunodetección: Se bloquearon las membranas en agitación con una solución TTBS al 5 % de leche. Se descartó la solución de bloqueo y sin lavar se incubaron directamente con la solución de anticuerpos primarios (en TTBS al 5 % de leche), durante toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente se realizaron 3 lavados sucesivos de 10 min de las membranas con solución TTBS y se incubaron con el anticuerpo secundario (1:5000, 1 h, temperatura ambiente), menos en el caso de la β -actina, ya que se trataba de un anticuerpo primario conjugado. Finalmente, se realizó otro período de 3 lavados de 10 min con TTBS y las membranas se revelaron por quimioluminiscencia incubándolas durante menos de 1 min en solución ECL Select® Western Blotting Detection Reagent. La foto del revelado se realizó en un equipo LAS-4000 Luminescent Image Analyzer. Para el análisis de la expresión proteica, se utilizó el programa ImageJ y la herramienta “Gel Analyzer”, realizando la densitometría de cada banda que se normalizó la medida a la de la expresión de β -actina. Los datos se representaron como cociente [proteína/ β -actina].

17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN DE LOS DATOS

Todos los datos presentados en la presente Tesis Doctoral están representados como la media \pm el error estándar del número de medidas descritas entre paréntesis (n), habiéndose utilizado siempre un mínimo de 3 experimentos independientes para cada valor. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (GraphPad Prism Software, San Diego, CA). Para todas las variables medidas, se realizó un test de normalidad D'Agostino-Pearson y en caso de que los datos siguiesen una distribución normal se compararon los grupos mediante un análisis *t* de Student (paramétrico o no paramétrico en función del tipo de experimento y las variables a comparar). En los casos en los que los datos no siguieron una distribución normal, se aplicó un análisis Mann-Whitney. El límite mínimo de significación se estableció en $*p \leq 0,05$, usándose también los valores de $**p \leq 0,01$ y $***p \leq 0,001$ cuando se alcanzaron estos grados de significación.

RESULTADOS

1. GENOTIPADO Y CONTROL DE LA COLONIA DE RATONES $SOD1^{G93A}$

Para la gestión de la colonia de ratones utilizados en los experimentos presentados en esta memoria, se genotipó cada camada y se identificaron los ratones que portaban el gen mutado (ratones $SOD1$); sus hermanos que no lo habían heredado (ratones C57) se usaron como control. La **Figura 17** muestra un ejemplo de una imagen de una PCR para una serie de muestras obtenidas de ratones recién destetados (P30). En ella se pueden apreciar las bandas de los genes amplificados bajo luz ultravioleta en el gel de agarosa donde se separó el ADN amplificado. A la izquierda de la imagen (primer pocillo) el marcador de pares de bases sirve de referencia del tamaño que tiene cada banda. Los genes amplificados fueron una secuencia de 324 pares de bases correspondientes a la interleucina de ratón (IL-2,) y una secuencia de 236 pares de bases correspondientes a la del gen $SOD1$ humano mutado ($SOD1^{G93A}$). Al ser más pequeña la secuencia de $SOD1$, su señal se encuentra debajo de la banda de la interleucina. Cuando en la muestra se identificaron dos bandas, fue incluida en el grupo $SOD1$; mientras que cuando se observó solo la banda de la interleucina se incluyó en el grupo C57. En cada PCR, se utilizaron como controles una muestra de un ratón transgénico (R+), una muestra de un ratón control (R-) y una muestra sin ADN que solo llevaba la mezcla para amplificar la PCR y monitorizar el proceso. Esta muestra sin ADN es un control de que no existe ningún tipo de contaminación, no debería amplificarse nada y sólo se observaría en ese carril el frente de la electroforesis que se corresponde con los cebadores del mix.

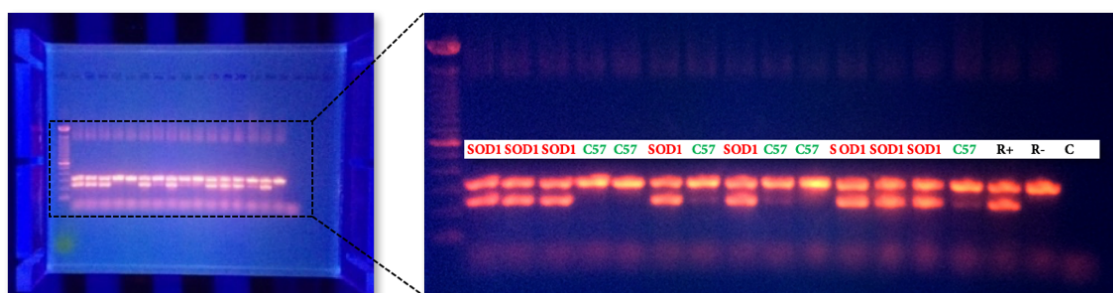


Figura 17. Genotipado de la colonia de ratones $SOD1^{G93A}$. Gel de agarosa bajo una lámpara de luz UV, con muestras de ADN de la colonia de ratones $SOD1^{G93A}$ amplificadas por PCR. Las bandas corresponden a un fragmento del gen de IL-2 (banda superior) y del gen $SOD1$ humano con la mutación G93A (banda inferior). Las muestras que amplificaron las dos bandas fueron los ratones $SOD1$ mientras que las que no amplificaron la banda inferior se seleccionaron como ratones control C57. Al final del gel se añadieron 3 muestras control de un ratón positivo (dos bandas) un ratón negativo (sólo banda superior) y una muestra sin ADN (no amplifica ninguna banda).

La edad de los ratones para agruparlos en etapa presintomática o sintomática se fijó en 30-45 días postnatal (grupo P30) y 120-140 días postnatal (grupo P120), en función de la

presencia o no de síntomas motores medidos por el test rotarod. Los resultados del test motor se muestran en la **Figura 18**. También se evaluó el peso de los animales a esas edades como parámetro de control complementario, ya que los animales pierden peso con el desarrollo de la enfermedad. Como se observa en la gráfica, sólo se observaron diferencias significativas en los ratones SOD1 a la edad sintomática P120, cuando los ratones transgénicos aguantaban sobre el cilindro menos de la mitad de tiempo que los ratones controles (45 ± 14 s en SOD frente a 91 ± 5 s en C57, $*p < 0,05$). De esta manera confirmamos la ausencia de síntomas motores a P30 (ambos grupos de ratones mostraron una latencia de caída de alrededor de 80 s), y a una manifestación sintomática significativa a P120 (**Figura 18 B**). Para este estudio, se forzó a los animales a andar sobre un cilindro que gira en su eje central y se contabilizó el tiempo que tardaban en caer del cilindro (latencia de caída). Para hacer una medida precisa de la actividad locomotora, se entrenó a los ratones el día anterior a la prueba para su adaptación y aprendizaje del test. La evolución del tiempo aguantado entre el día de prueba y el del test, muestra la mejoría debido al aprendizaje de la técnica (**Figura 18 C**). Además, en el análisis de los datos recopilados sobre el peso de los ratones, el otro parámetro de control de la sintomatología y evolución de la enfermedad, también encontramos una diferencia altamente significativa entre el grupo control y el transgénico sólo a la edad P120 ($27,2 \pm 0,3$ gr en C57 frente a $21,1 \pm 0,2$ gr en el grupo SOD1, $***p < 0,001$), mientras que en ambos grupos a P30 el peso de los ratones rondaban los 20 g (**Figura 18 A**).

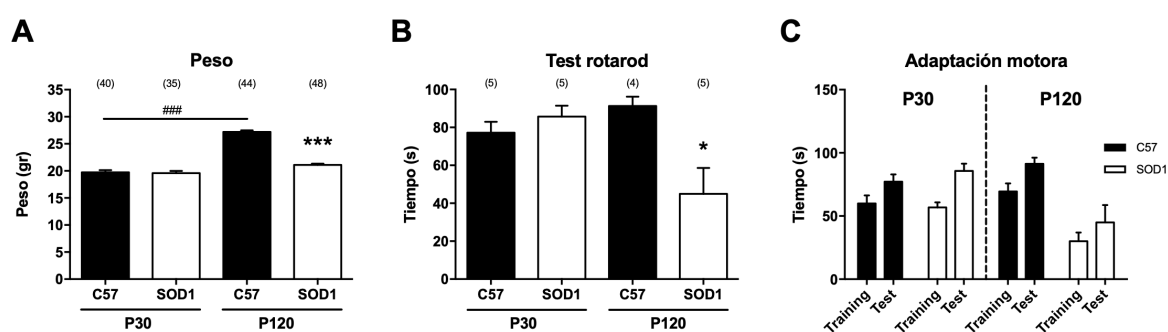


Figura 18. Evaluación de la función motora y del peso en el ratón SOD1^{G93A} en los grupos seleccionados como presintomáticos y sintomáticos. Para caracterizar el estado sintomático y presintomático en nuestro modelo animal, se monitorizaron los parámetros de peso corporal y de función motora a las dos edades de estudio (P30 y P120). **A**, resumen de la evolución del peso corporal con la edad en el grupo control (C57) y en el grupo modelo de ELA (SOD1). **B**, análisis cuantitativo del tiempo de latencia de caída en el test de rotarod, programado para girar a 89 rpm con una aceleración de 1 rpm cada 8 segundos. **C**, evolución del test rotarod entre el día de entrenamiento (training) y el día de prueba. Análisis estadístico mediante *t* de Student, $*p < 0,05$ y $***p < 0,001$ respecto a C57 a la misma edad, $###p < 0,001$ respecto a C57 P30, del número de animales mostrados entre paréntesis.

2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA hSOD1^{G93A}

2.1. La célula cromafín de los ratones transgénicos expresan la enzima SOD1 con la mutación patológica humana G93A (hSOD1^{G93A}), y aumenta con el progreso de la patología

Debido a la descripción de la ELA como una enfermedad de la motoneurona, iniciamos el proyecto caracterizando si nuestro modelo de estudio, la célula cromafín, expresaba la proteína mutada que causa la patología en este modelo animal. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia en cultivos celulares con el anticuerpo anti-SOD1 humana mutada C4F6. En más de 50 células individuales de 3 ratones distintos para cada grupo observamos, mediante microscopía de epifluorescencia, un aumento significativo en el marcaje fluorescente de los cultivos SOD frente a las células control. Comparando la señal entre cultivos SOD1 P30 y P120, el marcaje de la enzima mutada se incrementó un 54,3 % (**Figura 19 C**) lo que indica una mayor expresión o acumulación de esta proteína con el paso del tiempo; asociado probablemente al desarrollo de los síntomas.

Para completar el estudio adquirimos imágenes de células cromafines mediante microscopía confocal. En este caso, al realizar la inmunofluorescencia también se marcó la proteína mutada (en verde), el citoesqueleto con faloidina (en rojo) y los núcleos celulares con DAPI (en azul). Las imágenes muestran un patrón de señal de la proteína mutada en forma de puntos distribuídos por el citosol en las CC en el ratón SOD1 que aumentan con la edad, siendo mayor el marcaje a P30 que a P120 (**Figura 19 A,B**). Para cuantificar la expresión de la proteína mutada, se realizaron experimentos de *western blot* en muestras de médula suprarrenal de 5 ratones C57 y SOD1, a los dos grupos de edad. La inmunodetección con el anticuerpo contra la proteína humana mutada hSOD1^{G93A} indicó su especificidad, así como una marcada expresión en su estado monomérico, ya que no aparece señal en las muestras C57 y revela una banda definida en las muestras SOD1 (**Figura 19 D**). La densitometría de las bandas demostró que la expresión de la enzima mutada se incrementó un 49 % desde etapas presintomáticas hasta la instauración de los síntomas, normalizando la expresión a β -actina (**Figura 19 E**). Cabe mencionar que sobreexponiendo la membrana se puede observar cierta señal a la altura de la proteína dimerizada (32 kDa), tanto en el ratón C57 como SOD1, que puede corresponder a la proteína oxidada, ya que esta modificación expone epítomos que puede reconocer el anticuerpo.

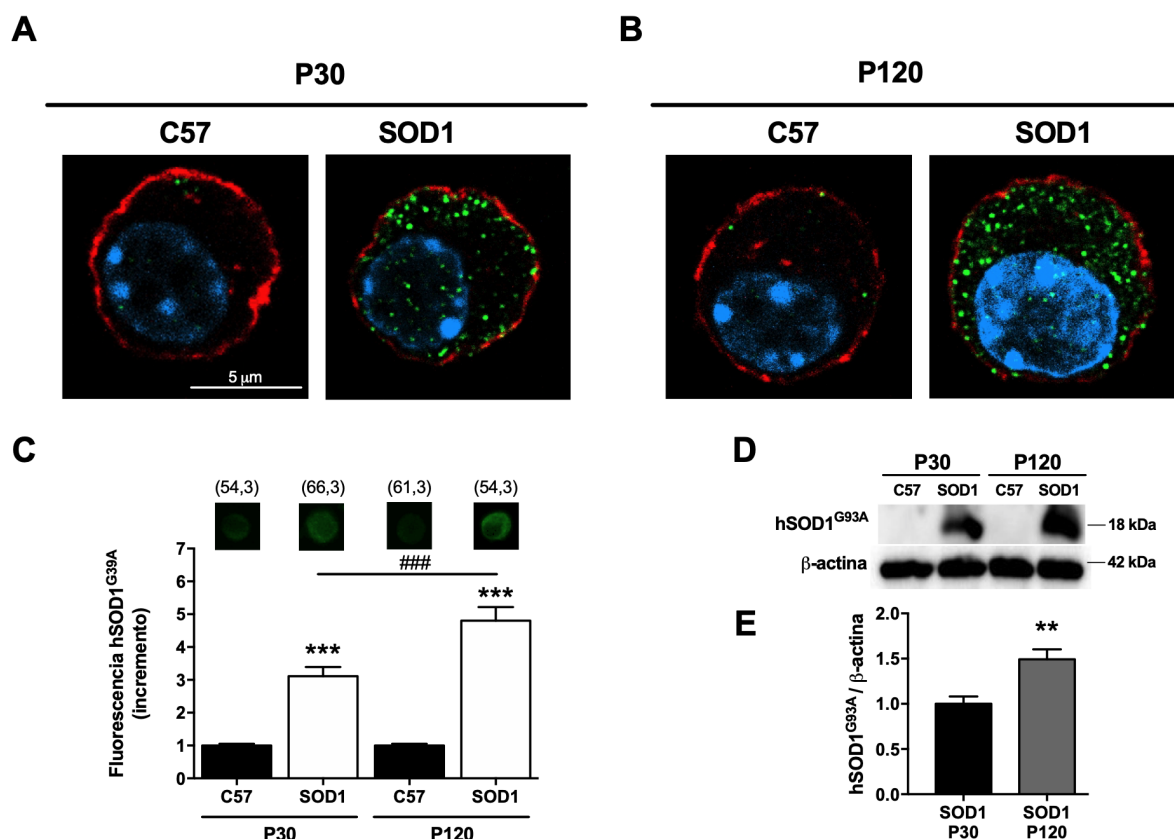


Figura 19. Expresión de la proteína mutada humana hSOD1^{G93A} en la célula cromafín del ratón SOD1^{G93A}. La expresión de la proteína mutada en la CC se comprobó mediante estudios de inmunofluorescencia y bioquímica (*western blot*). **A**, imagen de microscopía confocal de una célula cromafín C57 y una célula cromafín SOD1 fijadas, en donde destaca el citoesqueleto marcado con faloidina (en rojo), la proteína SOD1^{G93A} con el anticuerpo anti-hSOD1^{G93A} C4F6 (en verde), y el núcleo con DAPI (en azul). Las imágenes son de un cultivo celular de ratones presintomáticos (P30). **B**, imágenes de microscopía confocal con las mismas características que la anterior, pero de una edad sintomática (P120). **C**, análisis cuantitativo de la fluorescencia para hSOD1^{G93A} medida en cultivos de CC (n=3) mediante imágenes de epifluorescencia. Un ejemplo representativo de las células analizadas se muestra encima de cada barra de la gráfica (n=3, *** $p < 0,001$ frente a C57 a la misma edad; ### $p < 0,001$ comparado con SOD1 P30). **D**, inmunotransferencia mostrando la expresión de la enzima mutada en la médula adrenal de ratones C57 y SOD1 a edad presintomática y sintomática, utilizando la expresión de β -actina como control de carga. **E**, análisis cuantitativo de la expresión de hSOD1^{G93A}. El cálculo se realizó como el cociente de la densidad de la proteína total frente a la de β -actina (n=5, ** $p < 0,01$). Las barras representan la media \pm el error estándar

Para comparar la evolución y la expresión de la enzima mutada en la célula cromafín con lo que estaba sucediendo en el sistema nervioso central, se analizó la expresión en una porción de corteza motora de los mismos ratones SOD1^{G93A} que se utilizaron para analizar su médula adrenal. Mediante *western blot*, se cuantificó un incremento de su expresión en un 51 % a edad P120 respecto a P30 (**Figura 20**), en la línea de lo descrito anteriormente para la médula adrenal.

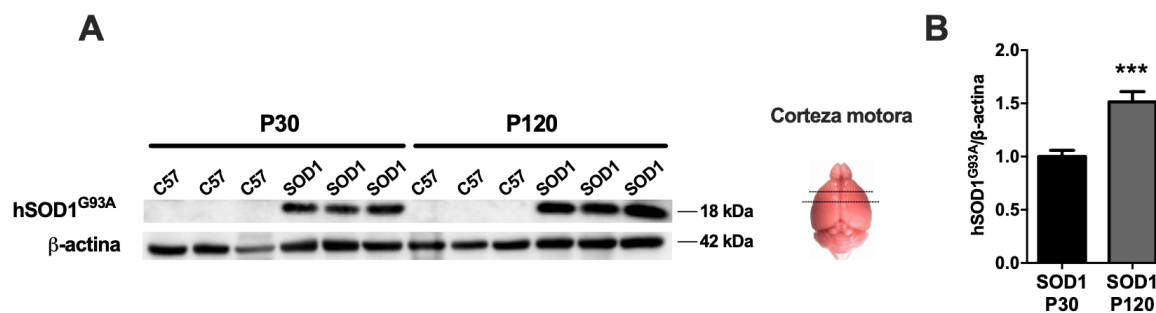


Figura 20. Expresión de la proteína mutada hSOD1^{G93A} en la corteza motora del ratón SOD1^{G93A}. **A**, inmunotransferencia mostrando la expresión de la enzima mutada en la corteza motora de ratones C57 y SOD1 a edad presintomática (P30) y sintomática (P120), utilizando la expresión de β-actina como control de carga. **B**, análisis cuantitativo de la expresión de hSOD1^{G93A} calculado como el cociente de la densidad de la proteína total en relación a la de su correspondiente β-actina (n=8, ****p* <0,001; *t* de Student). Las barras representan la media ± el error estándar.

3. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA MITOCONDRIA

Para analizar la morfología mitocondrial se realizó un estudio por microscopía electrónica de transmisión en cortes de médula suprarrenal de los ratones C57 y SOD1, tanto a edad presintomática (P30) como sintomática (P120). En la **Figura 21** se muestra una foto realizada en la CC de un ratón C57 P30 en la que se pueden distinguir los elementos subcelulares típicos de la célula cromafín, y en la que destacan sus características vesículas de secreción de núcleo denso que almacenan las catecolaminas. A un aumento de 5.000x, fotografiamos un corte medial de células cromafines enteras, en las que identificamos las mitocondrias individuales y cuantificamos tanto tamaño (medida como área en μm^2) como la densidad de mitocondrias en el citosol. Para el análisis de la ultraestructura de la mitocondria, se realizaron fotografías a mayor aumento (40.000x) y se analizaron las crestas presentes en cada mitocondria.

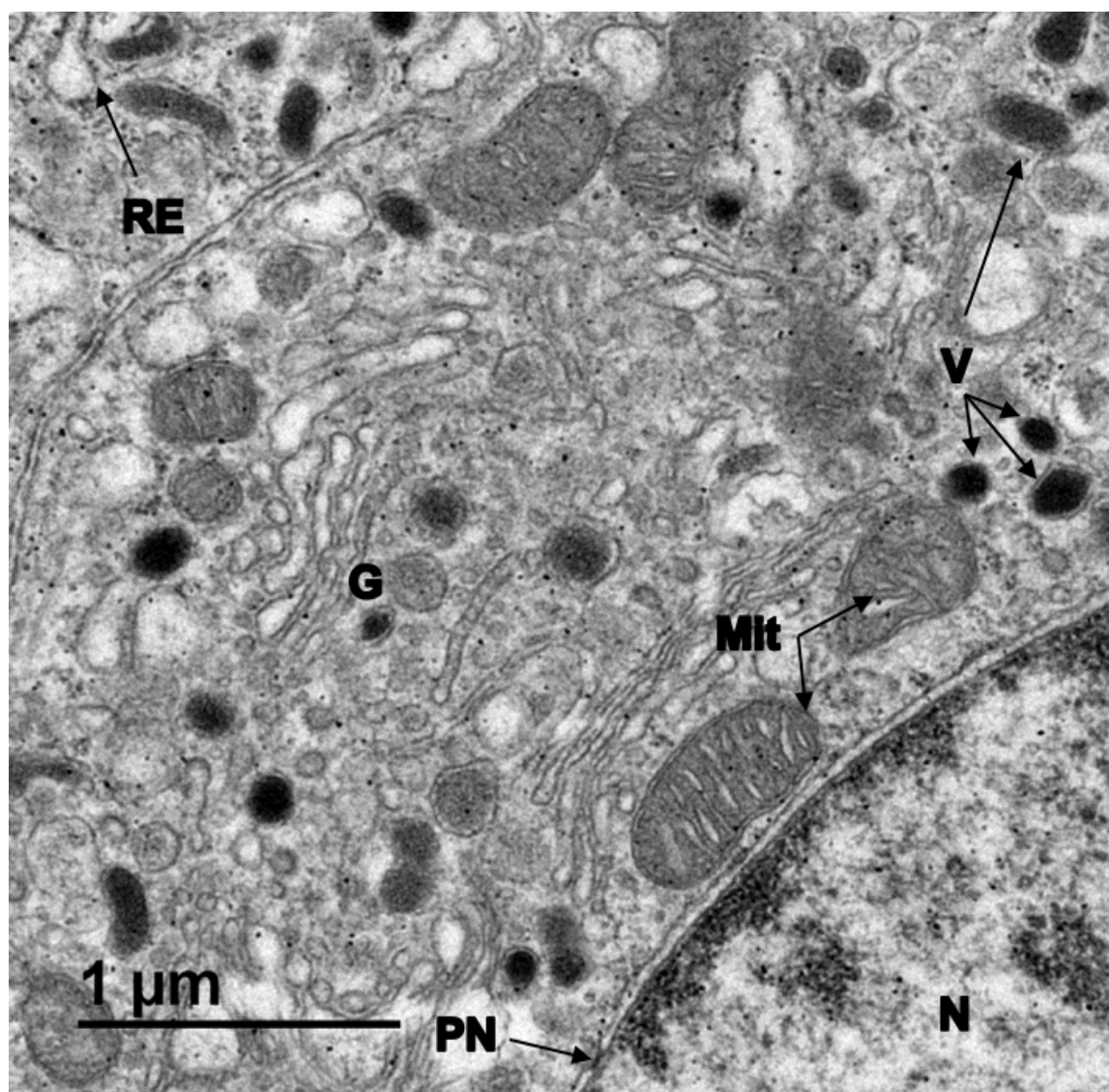


Figura 21. Microfotografía en microscopio electrónico de transmisión a 25000x aumentos de una CC de ratón control, en la que se pueden distinguir los distintos elementos subcelulares: núcleo (N), poro nuclear (PN), mitocondrias (Mit), aparato de Golgi (G), vesículas de secreción de neurotransmisores (V) y retículo endoplásmico rugoso (RE).

3.1. Daño mitocondrial en la célula cromafín del ratón $SOD1^{G93A}$.

La forma mitocondrial varía en las células cromafines entre circular, elíptica o incluso ramificada (**Figura 22 Aa-c**). La ultraestructura interna de las mitocondrias a edad P30 se encuentra predominantemente en un estado ortodoxo ($67,8 \pm 2,2$ % de la población mitocondrial), que se caracteriza por una matriz expandida. El perfil ortodoxo típico mostró crestas lamelares con un espaciamiento bastante regular ($30,8 \pm 2,8$ nm). Además, pueden coexistir formas más condensadas de mitocondrias ($32,1 \pm 2,2$ % de la población mitocondrial), que mostró una matriz compactada con compartimentos internos más grandes interconectados entre sí, o en todo el espacio intermembrana. La distancia entre

crestas de las mitocondrias condensadas es más estrecha que en el estado ortodoxo ($9,9 \pm 1,1$ nm). En el ratón control P120 hemos encontrado algunos cambios en comparación con P30, que podrían estar relacionados con el envejecimiento. La vacuolización se encontraron en $14,5 \pm 0,6$ % de la población mitocondrial. Cabe señalar que la vacuolización no se produjo en toda la población mitocondrial de manera homogénea, sino que se produjo solo en ciertos orgánulos, que se encuentran cerca del retículo endoplásmico rugoso dilatado. Además, aunque el hallazgo es raro, hemos encontrado una mitocondria con una ruptura de la membrana externa similar a la observada en SOD1^{G93A} en estados presintomáticos. No hemos encontrado cambios relacionados con el envejecimiento en el porcentaje de mitocondrias en cada forma estructural, ortodoxa ($67,7 \pm 2,4$ %) o condensado ($32,3 \pm 2,4$ %). Las estructuras mitocondriales típicas a la edad de P30 y P120 se muestran en la **Figura 22 A**.

El principal hallazgo en las mitocondrias de la célula cromafín del ratón SOD1^{G93A} a edad P30 fue la mayor presencia de la vacuolización de la matriz mitocondrial interna ($82,7 \pm 3,4$ %) y el hinchamiento de las crestas, que se produjo principalmente a partir de un estado ortodoxo de mitocondrias ($86,0 \pm 3$ %). Un $17,6 \pm 0,2$ % se caracterizaron por presentar una hernia que resultó en una membrana mitocondrial expandida. Cabe destacar que el hinchamiento mitocondrial se desarrolló en un $16,3 \pm 0,3$ % de los casos en el espacio intermembrana límite (**Figura 22 Bd**), un $15,5 \pm 4,4$ % en la matriz (**Figura 22 Be,f,g**) y en un $68,1 \pm 4,1$ % en la cresta mitocondrial (**Figura 22 Ba-f**). Solo un porcentaje escaso de esas hernias ($4,2 \pm 0,8$ %) mostró rotura de la membrana mitocondrial externa (**Figura 22 Bb,c**). Finalmente, aproximadamente el 8 % de las mitocondrias mostraron un estado desorganizado, caracterizado por la interrupción de las crestas. Estos resultados se obtuvieron de más de 300 mitocondrias estudiadas de al menos tres animales diferentes. No hemos observado diferencias drásticas entre las etapas P30 y P120 en ratones SOD1^{G93A} en relación con la ultraestructura interna de las mitocondrias. Como ocurrió en la etapa P30, el estado ortodoxo se encontró en un $88,4 \pm 5,8$ % de mitocondrias a P120, pero la principal diferencia fue que un 21,7 % de ellos presentaba una ultraestructura desorganizada, con ruptura de la cresta mitocondrial. La hinchazón de las crestas mitocondriales acontece en un porcentaje similar al de la etapa P30 ($80,7 \pm 6,5$ %), pero fue interesante observar que se había roto la membrana mitocondrial externa con pérdida de su contenido, en un porcentaje mayor ($7,9 \pm 1,1$ frente a $4,2 \pm 0,8$ % a P30; * $p < 0,05$). La expansión de la matriz mitocondrial, el espacio intermembrana o las crestas no fue diferente al descrito en SOD1^{G93A} a la edad de 30 días (ver **Figura 22 B**).

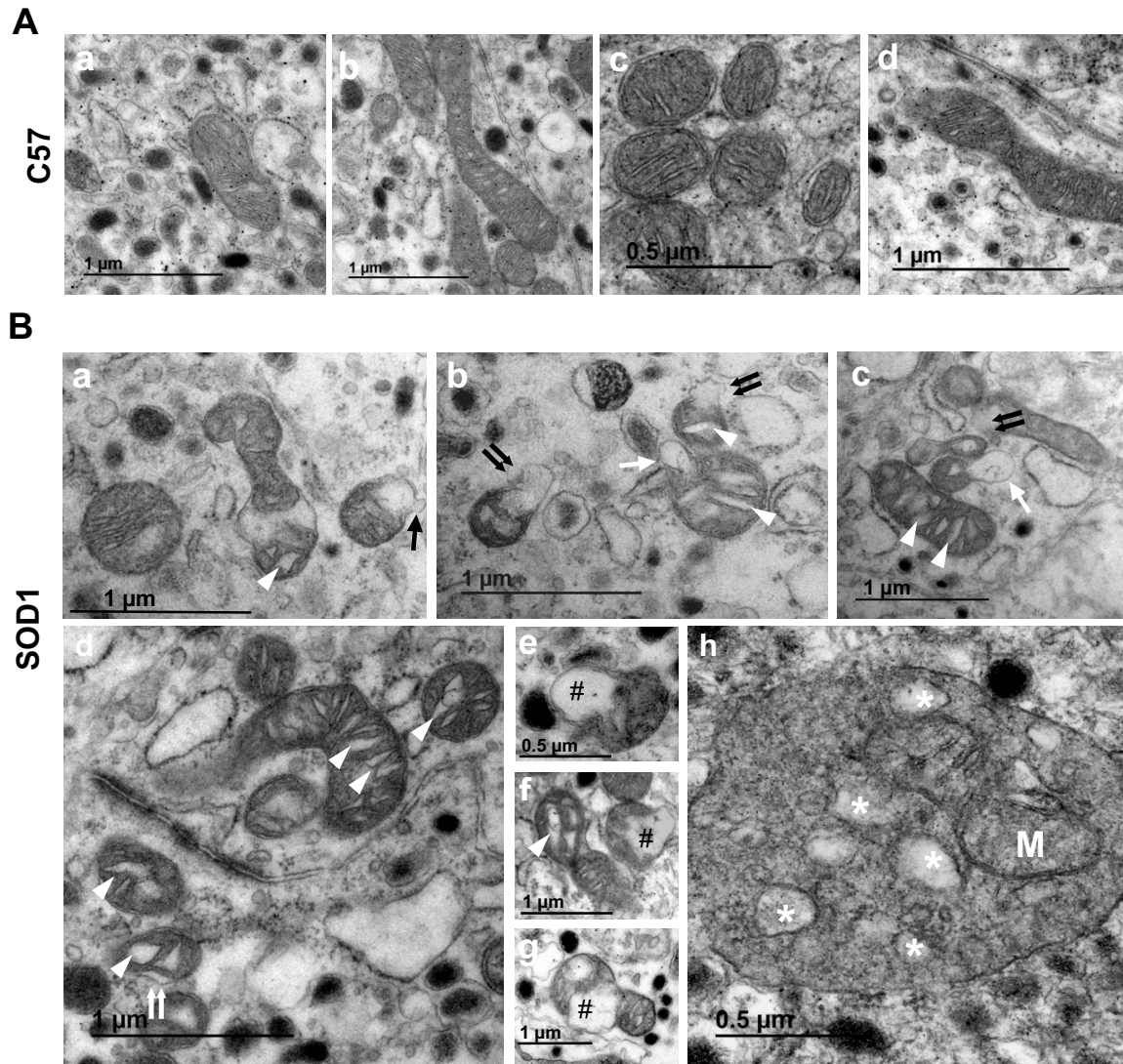


Figura 22. Daño mitocondrial en la célula cromafín del ratón $SOD1^{G93A}$. A, Imágenes de microscopía electrónica de transmisión mostrando mitocondrias de la célula cromafín de ratones control (C57), tanto a edad presintomática (P30, **Aa,b**) como sintomática (P120, **Ac,d**). Prestar atención a la abundancia de vesículas de núcleo denso que contienen catecolaminas diseminadas por el citosol, típicas de la célula cromafín. Las mitocondrias del ratón control presentan una distribución regular de membranas, con crestas lamelares delgadas y paralelas entre sí. B, Microfotografías realizadas en células cromafín de ratones transgénicos SOD1 a ambas edades de estudio, mostrando los distintos tipos de alteración mitocondrial encontrados: formación de vesículas de mitocondrias (**Ba**; flecha negra), vacuolas mitocondriales derivadas de la matriz o crestas (**Bb,c**; flecha blanca), dilatación de crestas (**Ba,b,c,d,f**, cabeza de flecha blanca), ruptura de la membrana mitocondrial (**Bb,c**; flecha negra doble), expansión del espacio intermembrana (**Bd**, flecha blanca doble) dilatación de matriz mitocondrial (**Be,f,g** almohadilla negra) y mitocondrias en procesos de degradación en mitofagosomas (**Bh**), donde las organelas en degradación están señaladas con un asterisco. Todas las imágenes se realizaron en células cromafines de cortes de médula adrenal de al menos 3 ratones.

3.2. La dinámica mitocondrial se encuentra alterada en la célula cromafín del ratón SOD1^{G93A}, presentando una fusión disminuida desde estados presintomáticos

El balance de la dinámica mitocondrial, definido como el resultado de los procesos de fusión y fisión que están ocurriendo en la célula, se analizó mediante la cuantificación del tamaño medio de las mitocondrias observadas en un plano medial de la célula cromafín (**Figura 23 A-C**). En este tipo de corte de tejido de médula adrenal, observamos la célula separada por su membrana celular de las células adyacentes, donde dos tercios de su superficie está ocupado por citosol y un tercio por el núcleo dispuesto de manera excéntrica.

El número de mitocondrias en tejido de médula adrenal, normalizado a μm^2 de citosol, disminuyó de manera fisiológica con la edad en el grupo control, de $0,370 \pm 0,003$ mitocondrias/ μm^2 en P30 a $0,237 \pm 0,002$ mitocondrias/ μm^2 en P120 (**Figura 23 E**). Por otro lado, el tamaño medio de estas mitocondrias se incrementó de $0,218 \pm 0,008 \mu\text{m}^2$ a $0,244 \pm 0,014 \mu\text{m}^2$ (**Figura 23 F**). Estos resultados indican que durante la maduración de la célula cromafín, aumenta el tamaño mitocondrial, disminuyendo en número. Esta tendencia contrasta con lo que ocurre en la CC del ratón SOD1, donde la densidad mitocondrial fue estadísticamente menor que la del control a P30 ($0,299 \pm 0,003$ mitocondrias/ μm^2 , $*p > 0,05$) pero mayor a P120 ($0,331 \pm 0,019$ mitocondrias/ μm^2 , $***p > 0,001$). Además, el tamaño mitocondrial fue siempre menor respecto a las mitocondrias de la CC de ratones control, siendo un 15 % más pequeñas en etapas presintomáticas y hasta un 32 % menor en etapas sintomáticas ($0,1844 \pm 0,009 \mu\text{m}^2$ a P30 y $0,1651 \pm 0,007 \mu\text{m}^2$ a P120, $*p > 0,05$; $***p > 0,001$ respectivamente). Esta alteración en la dinámica mitocondrial durante la maduración celular, se agrava con la consolidación de la enfermedad, lo que demuestra en cierta manera un problema en la maquinaria de fusión de las mitocondrias pequeñas en la CC del ratón SOD1^{G93A}. En las fotos de la **Figura 23** podemos apreciar una célula completa en la médula adrenal de cada grupo, donde se aprecia el número y la disposición de las mitocondrias, así como una alteración en la estructura interna mitocondrial del grupo SOD1, comparado con el control a las dos edades de estudio (observar las ampliaciones de zonas con alta densidad de mitocondrias, **Figura 23 A',B',C',D'**).

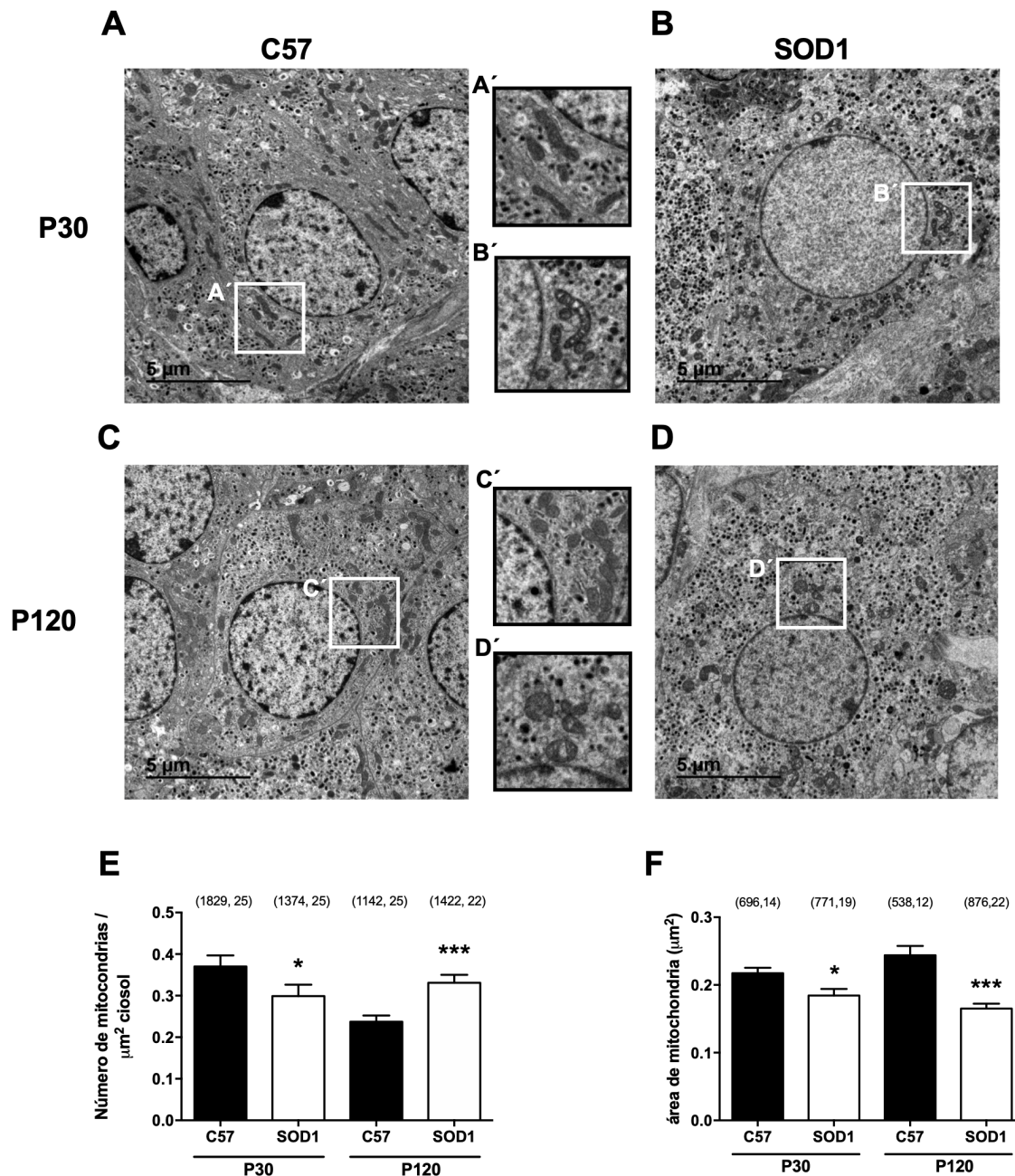


Figura 23. La densidad y el tamaño de mitocondrias en la CC del ratón SOD1^{G93A} evidencian alteraciones en la dinámica mitocondrial. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión realizadas a 5000x en cortes de médula adrenal de ratones C57 y SOD1 (n=3). En cada foto se puede observar un corte transversal de una célula cromafín a edad presintomática P30 (A,B) o sintomática P120 (C,D). En el medio de las dos imágenes se muestra una ampliación de una zona con abundantes mitocondrias marcada con un recuadro sobre la foto. Nótese la alteración del interior mitocondrial en el caso del ratón transgénico a ambas edades (A',B',C',D'). E, análisis cuantitativo del número de mitocondrias normalizado a μm^2 de citosol. El número de mitocondrias y fotos analizadas se muestran entre paréntesis. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$, Mann-Whitney test comparado con C57 a la misma edad. F, análisis cuantitativo del tamaño medio del total de las mitocondrias analizadas. Los resultados se expresan como superficie en μm^2 . Las barras representan la media \pm el error estándar de al menos 3 animales. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ *t* de Student despareado, comparado con el control a su misma edad.

3.3. Alteración en la estructura de crestas mitocondriales

La ultraestructura interna de la mitocondria se analizó a partir de las imágenes adquiridas a 40.000x, donde las membranas externa, interna, y las crestas mitocondriales, eran fácilmente distinguibles. En los casos más complicados de analizar, la modificación del brillo y contraste de la imagen facilitó la correcta selección de las estructuras. La **Figura 24 A** muestra una mitocondria representativa de cada grupo, en la que se puede observar la evidente dilatación de crestas en las mitocondrias del grupo SOD1 tanto a P30 como a P120. El número de crestas por μm^2 de área mitocondrial fue menor en el ratón SOD1 a edad presintomática (34 ± 2 en SOD1 frente a 44 ± 4 en C57, $*p < 0.05$), pero no se encontraron diferencias significativas a edad sintomática (51 ± 4 en C57 y 60 ± 4 in SOD1) (**Figura 24 B**). Posteriormente, analizamos el área media de la cresta y el área ocupada por las crestas respecto al tamaño de cada mitocondria. El área media de la cresta fue significativamente superior en el grupo SOD1 respecto a su control a ambas edades (**Figura 24 C**), manteniendo unos valores medios constantes en cada grupo de manera independiente de la edad (aumentó de $0,0040 \pm 0,0001 \mu\text{m}^2$ (P30) y $0,0035 \pm 0,0001 \mu\text{m}^2$ (P120) en el grupo C57, a $0,0070 \pm 0,0005 \mu\text{m}^2$ (P30) y $0,0077 \pm 0,0006 \mu\text{m}^2$ (P120) en el grupo SOD1). Debido a esta dilatación significativa de las crestas, al analizar el área de cada mitocondria ocupada por estas estructuras (**Figura 24 D**), encontramos un incremento en el grupo SOD1 respecto al control (de 20 % a 31 % en P30 y de 19 % a 47 % en P120). Este incremento también fue significativo si comparamos los dos grupos SOD1 con la edad ($***p < 0,001$), por lo que la dilatación de crestas y su efecto en la ultraestructura mitocondrial aumenta de manera progresiva con la instauración de la enfermedad.

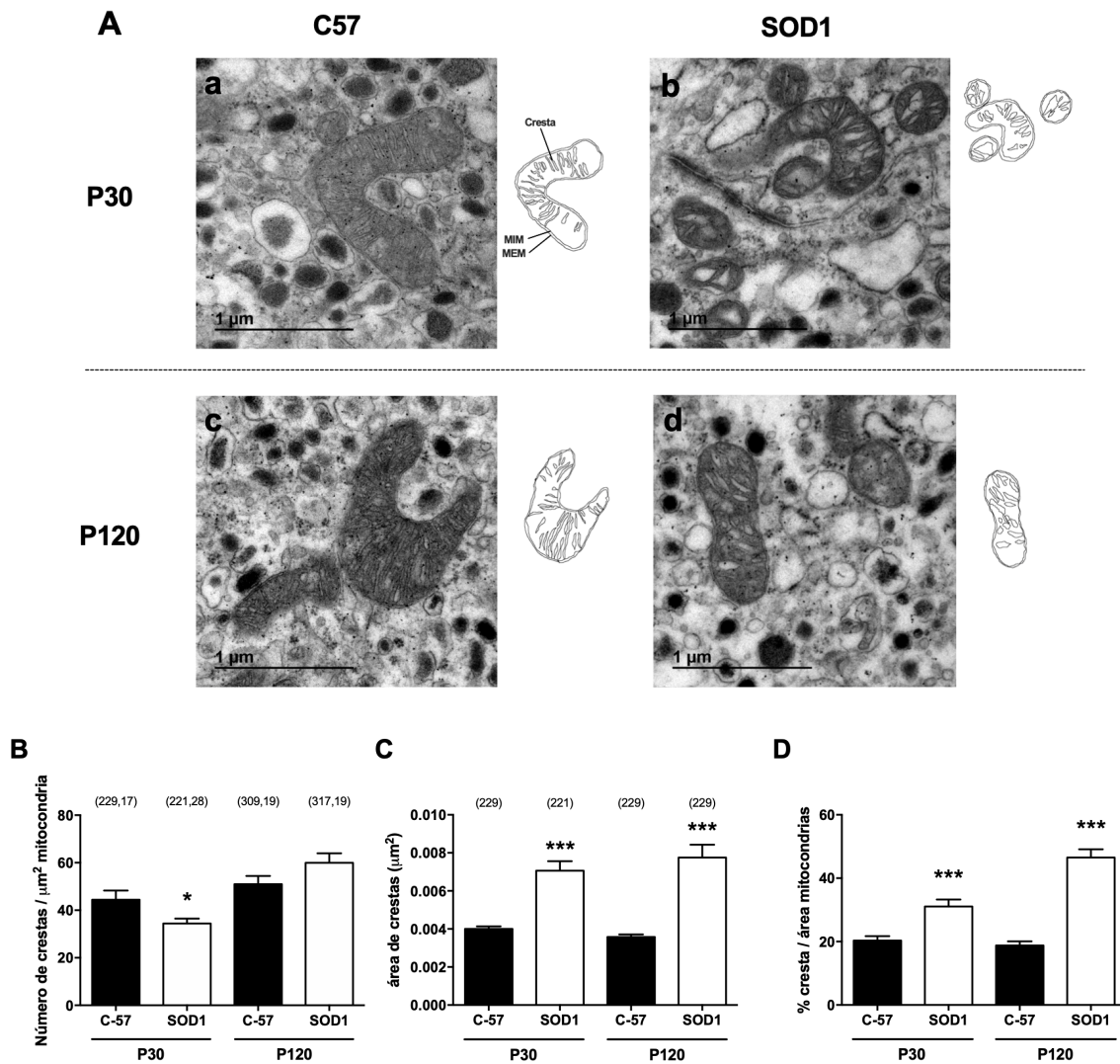


Figura 24. Hinchamiento de crestas en la CC del ratón SOD1^{G93A}. A, imágenes de microscopía electrónica de transmisión realizadas a 40000x en cortes de médula adrenal de ratones C57 y SOD1, que muestran mitocondrias a edad presintomática P30 (a,b) o sintomática P120 (c,d). A la derecha de cada imagen se muestra una representación de las mitocondrias analizadas, perfilando su membrana interna (MIM), su membrana externa (MEM) y las crestas. B, análisis cuantitativo del número de crestas observadas por área de mitocondria, en el total de mitocondrias analizadas y mostradas entre paréntesis. C, análisis cuantitativo del área media de las crestas en μm^2 . D, análisis del área de mitocondria ocupada por crestas expresado en porcentaje. Las barras representan la media \pm el error estándar del número de mitocondrias mostrado entre paréntesis y de al menos 3 animales. Análisis estadístico mediante *t* de Student, **p* < 0,05 y ****p* < 0,001 respecto a C57 a la misma edad.

3.4. Incremento del tamaño del anclaje de crestas

La zona de plegamiento de la membrana interna mitocondrial para formar las crestas, forma un poro hacia el espacio intermembrana, de tamaño conservado, que evita la difusión de los elementos contenidos en la matriz de la cresta, y también mantiene la asimetría entre las proteínas de membrana embebidas en las crestas, como los complejos respiratorios, y con aquellas proteínas de la membrana interna mitocondrial (MMI). Este poro o zona de anclaje, denominado uniones o pie de crestas, es trascendental para la correcta función mitocondrial, pues se ve alterado en numerosas patologías o procesos de daño celular. En nuestro proyecto de investigación, para cuantificar el tamaño de este poro, se localizó en las fotografías de las crestas en las que el corte permitía ver su zona de unión con la MMI. La **Figura 25 A** resume con ejemplos las mitocondrias analizadas y una ampliación de la cresta en la que se observa el anclaje con la MMI. Debajo de cada foto se dibujó una representación de la cresta en donde se señala la zona de anclaje, con la medida del poro en nm, calibrado a la escala de la foto. El análisis cuantitativo (**Figura 25 B**) mostró un tamaño de uniones de cresta constante en el grupo control que no cambió significativamente con la edad ($13,75 \pm 1$ nm a P30 y 15 ± 1 nm a P120), pero encontramos un aumento significativo en el grupo SOD1, siendo un 72 % mayor a edad presintomática ($23,7 \pm 3$ nm, $**p < 0,01$), y hasta un 206 % mayor en el estado sintomático ($45,9 \pm 10$ nm, $***p < 0,001$). Esos valores indican que la medida las uniones de cresta es sensible para correlacionar la alteración mitocondrial con la evolución clínica de la enfermedad.

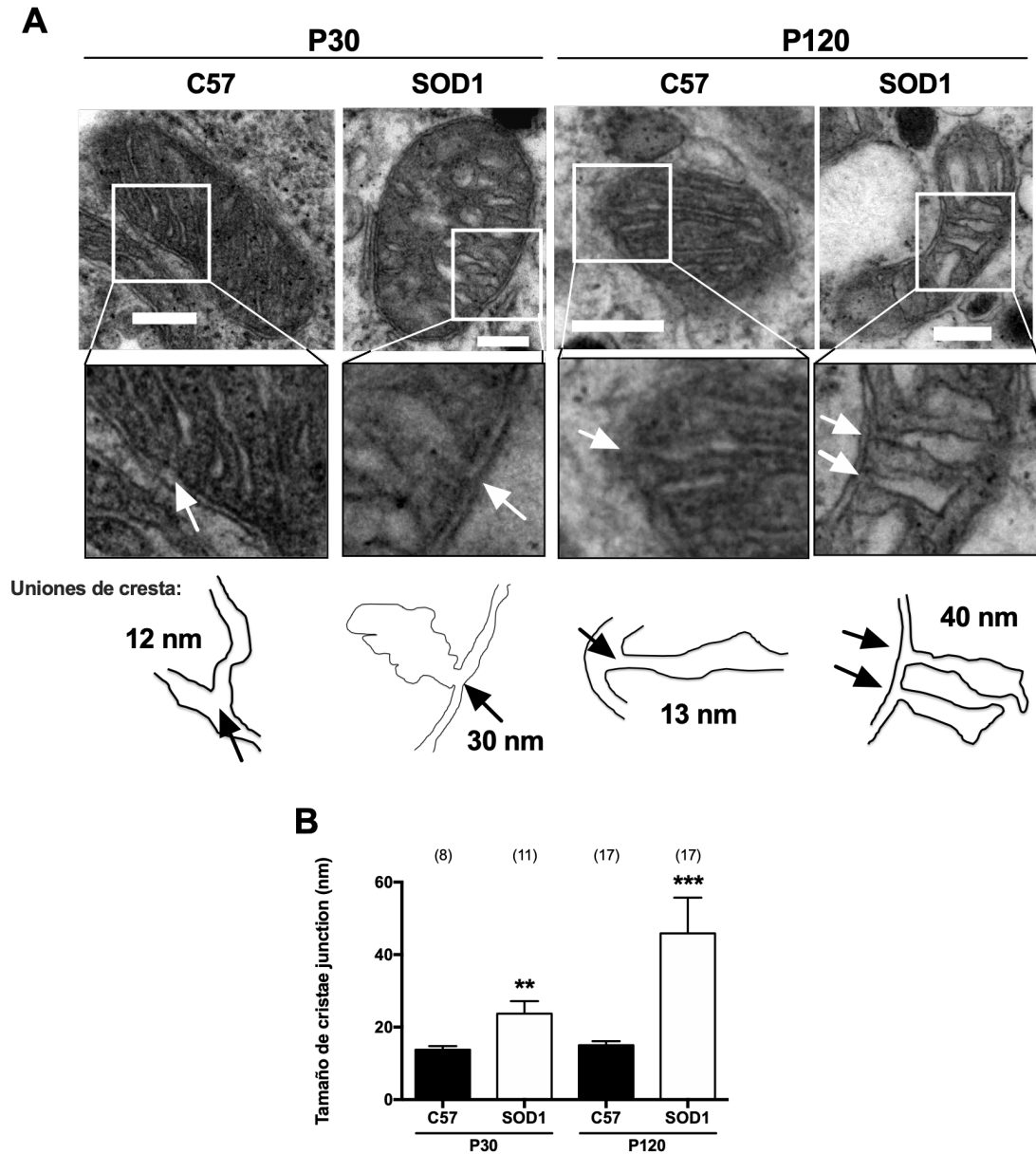


Figura 25. Mayor tamaño de las uniones de las crestas en las mitocondrias de la célula cromafín del ratón SOD1^{G93A}. **A**, microfotografías de microscopía electrónica de transmisión realizadas a 40000x en cortes de médula adrenal de ratones C57 y SOD1 que muestran una mitocondria a edad presintomática (P30) o sintomática (P120). Debajo de cada imagen se muestra una ampliación de una zona en la que el corte permite observar la formación de la cresta y su unión con la membrana interna mitocondrial, señalado con flechas blancas. Debajo de las fotografías, una representación gráfica de la unión de cresta analizada con el tamaño del poro que se forma. **B**, análisis cuantitativo del tamaño de la unión cresta-membrana interna mitocondrial (en nm). Las barras representan la media \pm el error estándar. Análisis estadístico mediante *t* de Student, ***p* < 0,01 y ****p* < 0,001 comparado con el control a su misma edad. Escala = 200 nm

4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA MITOCONDRIA

La función mitocondrial se evaluó a través de ensayos relacionados con distintos procesos de la actividad mitocondrial. Se evaluó su potencial de membrana, la generación de radicales libres, su perfil bioenergético y la cantidad de ATP celular. Estos parámetros dan una idea global de la función mitocondrial, analizándola a varios niveles en la célula cromafín del ratón SOD1^{G93A}, tanto a edad presintomática como su evolución al instaurarse los síntomas.

4.1. El potencial de membrana mitocondrial está disminuido en las CC del ratón SOD1^{G93A} desde etapas presintomáticas

Para analizar el potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) se utilizó la sonda fluorescente TMRE (25 nM). Al tratarse de un catión de libre difusión por membranas, se acumula en la mitocondria debido a su Ψ_m negativo (**Figura 26**). El valor del potencial de membrana lo cuantificamos provocando la salida de la sonda al perfundir las células con el protonóforo FCCP (3 μ M). El FCCP lleva el Ψ_m a valores mínimos, pues modifica el equilibrio de protones en la mitocondria, disipando así su asimetría estequiométrica a ambos lados de la membrana.

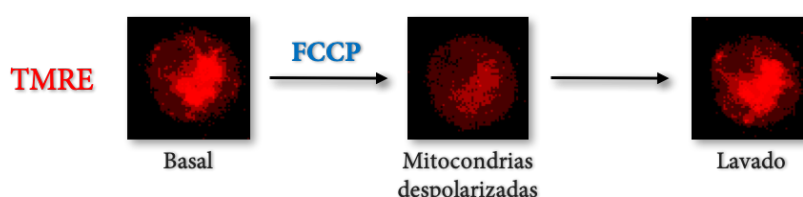


Figura 26. Cambio del Ψ_m en las células cromafines inducido por FCCP. Ejemplo de CC en cultivo incubada con TMRE (Basal), con su potencial de membrana intacto y las mitocondrias fuertemente marcadas con la sonda (nótese el hueco del núcleo). El tratamiento con FCCP refleja la pérdida de fluorescencia por la pérdida del Ψ_m . El lavado del protonóforo revierte la situación y, una vez restaurado el potencial de membrana mitocondrial, la sonda se internaliza y de nuevo se recupera la fluorescencia.

La **Figura 27 A** muestra una representación tridimensional de una célula cargada con la sonda, donde la intensidad de fluorescencia se muestra en picos que son mayores en las zonas ricas en mitocondrias y que poseen mayor cantidad de sonda. En el ejemplo de la imagen de la izquierda se observa que la carga basal en las células cromafines de los ratones SOD1 (izquierda inferior) fue menor que en el grupo C57 (izquierda, superior). Durante la administración de FCCP, que se puede observar en las imágenes de la derecha, se observa que desaparecen la intensidad del marcaje representada por picos de fluorescencia. El registro del experimento completo se resume en la **Figura 27 B,D**, donde se muestra la media \pm el error estándar de todas las medidas de fluorescencia realizadas en células individuales de un mínimo

de 3 experimentos por grupo (a P30 y P120 respectivamente). La fluorescencia basal media de las CC de los ratones SOD1^{G93A} fue un 21,9 % menor respecto al control a la edad P30 y un 17,1 % menor a P120 ($***p < 0,001$ en ambos casos). Durante el tratamiento con FCCP se puede observar cómo se produce una caída en la medida de fluorescencia, que se recupera tras el lavado del fármaco. La diferencia de fluorescencia entre el estado basal y tras la despolarización máxima mitocondrial fue menor en los cultivos de ratón transgénico ($20,3 \pm 1,5$ UAF) frente a los de ratón control C57 ($35,3 \pm 3,1$ UAF) lo que indica una alteración en el Ψ_m en la CC a edades presintomáticas ($*p < 0,05$). De manera análoga, en los experimentos con cultivos celulares de ratones a edad sintomática, el valor en el cambio de intensidad de fluorescencia obtenido fue también menor en el grupo SOD1 ($26,2 \pm 3,2$ UAF frente a los $51,23 \pm 5,6$ UAF obtenidos en el grupo control P120, $***p < 0,001$). Esto supone que la despolarización de la mitocondria fue un 42,6 % menor a edad presintomática y un 48,8 % a edad sintomática respecto a sus controles.

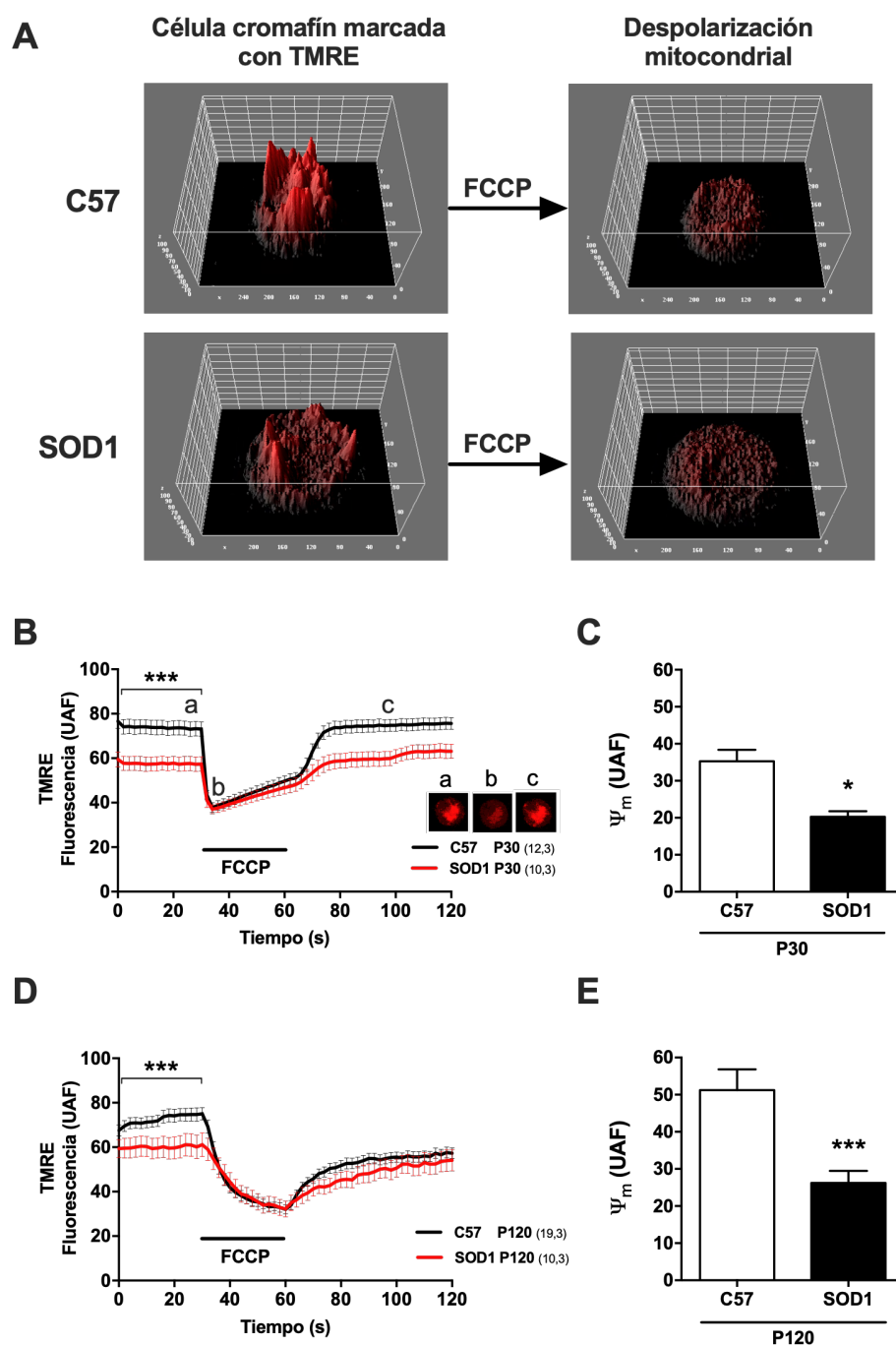


Figura 27. Potencial de membrana mitocondrial alterado en la CC del ratón SOD1^{G93A}. El estudio del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) se realizó con la sonda catiónica mitocondrial TMRE (25 nM), en cultivos de células cromafines de ratones C57 y SOD1 a edad presintomática (P30) y sintomática (P120). **A**, representación tridimensional de la intensidad de fluorescencia de la sonda TMRE en células cromafines de ratones C57 y SOD1. Las imágenes de la izquierda muestran la fluorescencia en estado basal, siendo mayor en las zonas donde se acumulan las mitocondrias. Las imágenes de la derecha muestran la intensidad de fluorescencia tras su despolarización con el protonóforo FCCP, que provoca la salida de la sonda de las mitocondrias. **B** y **D** muestran las medias del registro de la intensidad media de fluorescencia en las zonas de alta concentración de mitocondrias a lo largo de los 2 min de duración del experimento (30-seg en estado basal, 30-seg de despolarización con FCCP y 1-min de lavado), a edad presintomática (P30, **B**) y sintomática (P120, **D**). En la gráfica **B**, se muestran 3 fotografías originales de células durante el registro en las siguientes etapas: **a**) fluorescencia basal, **b**) fluorescencia tras la despolarización mitocondrial, **c**) lavado del protonóforo y recuperación de la fluorescencia. El potencial de membrana se cuantificó como la diferencia en la intensidad de fluorescencia tras la despolarización con FCCP respecto a la fluorescencia basal, como se muestra en las gráficas **C** y **E**. Las barras representan la media \pm el error estándar del número de células mostrado entre paréntesis. Análisis estadístico mediante *t* de Student, **p* < 0,05 y ****p* < 0,001 comparado con el control a su misma edad.

4.2. La célula cromafín del ratón SOD1^{G93A} presenta un mayor estrés oxidativo celular desde edades presintomáticas, que se incrementa con la edad y con el desarrollo de la enfermedad

Una manera de estudiar el equilibrio redox celular global es analizar la oxidación de moléculas endógenas como lípidos o proteínas por los radicales libres que se generan con la actividad biológica celular, principalmente durante la síntesis de ATP en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. En el caso de este estudio, se administró a los cultivos de células cromafines una molécula fluorescente exógena, el CM-H₂DCFDA. Esta molécula es un derivado de la diclorfluoresceína en estado reducido, que al oxidarse emite fluorescencia. Esta propiedad permite su uso como un indicador de las especies reactivas de oxígeno (ROS) globales de la célula. En la siguiente figura se puede ver un ejemplo de los cultivos de CC tras la incubación con la sonda y el inicio del experimento (t_0) para todos los 4 grupos de estudio: C57 y SOD1 a P30 y P120. A la derecha de cada imagen, se muestra la última foto del experimento (tras 30 minutos de monitorización, t_{30}) en la que podemos observar cómo se incrementó la fluorescencia en cada célula (**Figura 28**).

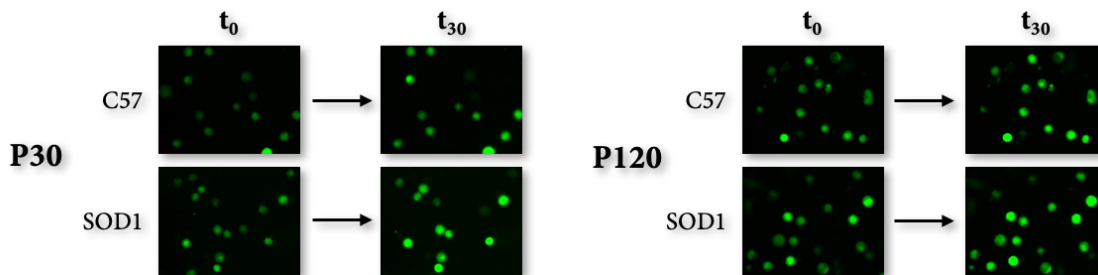


Figura 28. Oxidación de la sonda CM-H₂DCFDA en cultivos de CC de ratones control C57 y SOD1 a edad presintomática (P30) y sintomática (P120). Las imágenes a t_0 muestran la fluorescencia basal al inicio del experimento, tras la incubación de los cultivos con la sonda. A la derecha de cada imagen se observa el incremento de fluorescencia que se produce al final de los 30 minutos de registro (t_{30}).

La **Figura 29 A** muestra una imagen en 3D de una CC representativa de cada grupo al inicio y al final del experimento (t_0 y t_{30}). La fluorescencia registrada en la célula se representa con picos pseudocoloreados en función de su intensidad. El incremento de fluorescencia a t_{30} respecto a t_0 , debida la oxidación de la sonda, es evidente en ambos grupos, observándose una mayor oxidación en las células del grupo SOD1 respecto al grupo C57. Este incremento de fluorescencia se midió en al menos 22 células en 4 experimentos distintos, y fue de un 62 % mayor en el SOD1 respecto a su control a P30 ($43,2 \pm 6,6$ UAF y $26,7 \pm 4,4$ UAF respectivamente, **Figura 29 E**) y un 48 % mayor en los cultivos de ratones SOD1 sintomáticos P120 respecto a su control ($76,8 \pm 5,8$ UAF y $51,3 \pm 5$ UAF respectivamente, **Figura 29 G**).

Para cuantificar la cinética de la actividad oxidante en las CC, se calculó la pendiente media de las rectas obtenidas en los registros de oxidación de la sonda (incremento de la fluorescencia en cada célula individual). Esta cinética representa las unidades de fluorescencia que aumentó por minuto de registro en cada grupo (**Figura 29 F,H**). De este modo, observamos que la oxidación es un fenómeno dependiente de la edad (de $0,76 \pm 0,12$ UAF/min en C57 P30 a $1,71 \pm 0,17$ UAF/min en C57 P120). Sin embargo, en las CC del ratón transgénico SOD1 la oxidación siempre fue más rápida, comparada con el control a la misma edad: $1,33 \pm 0,22$ UAF/min a P30 ($*p < 0,05$) y $2,67 \pm 0,19$ UAF/min a P120 ($***p < 0,001$).

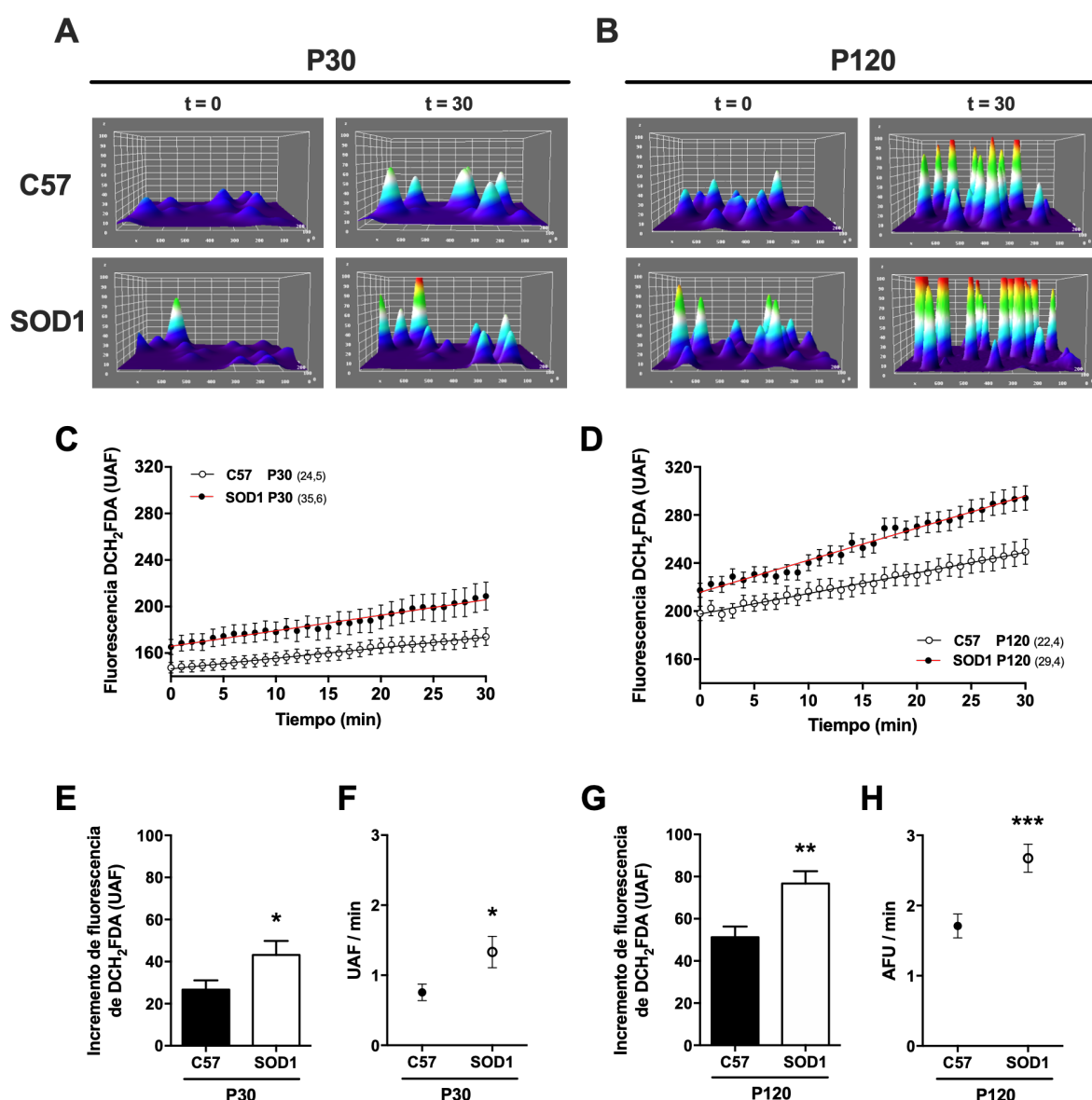


Figura 29. La producción de ROS está incrementada en la CC del ratón SOD1^{G93A}. La evaluación del estrés oxidativo celular se realizó en cultivos de CC incubadas con la sonda DCH₂FDA, en estado basal durante 30 minutos. Esta sonda incrementa su fluorescencia al ser oxidada por las distintas especies reactivas de oxígeno (ROS) celulares, lo que correlaciona con el estado oxidativo celular. **A** y **B** muestran una representación tridimensional de la intensidad de fluorescencia de la sonda en una célula cromafín de los ratones C57 y SOD1 a edad presintomática (P30) y sintomática

(P120), respectivamente. En cada caso se muestra una representación al inicio ($t=0$) y al final ($t=30$) del experimento, donde se observa un aumento de fluorescencia. **C** y **D** muestran las medias del registro de la fluorescencia durante 30 minutos en cada célula individual, tomando fotos a intervalos de 1 minuto. La diferencia de la intensidad de fluorescencia entre el registro a tiempo 0 y a los 30 minutos, representa el estado de oxidación de la célula. **E** y **G** análisis cuantitativo del incremento de fluorescencia durante el experimento en P30 y P120. La pendiente de la recta a la que se ajusta este incremento de fluorescencia muestra la velocidad de oxidación de la sonda, que se representa en las gráficas **F** y **H**. Los datos se representan como la media \pm el error estándar del número de células y cultivos mostrado entre paréntesis. Análisis estadístico mediante *t* de Student, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ comparado con C57.

4.3. Alteraciones en la bioenergética celular en la CC del modelo SOD1^{G93A}

Para completar el estudio bioenergético en nuestro modelo y su evolución con la edad y la patología, se realizó un análisis de la respiración celular con un protocolo de inducción de estrés mitocondrial. Se monitorizó la ratio de consumo de oxígeno (OCR) en cultivos celulares de CC en al menos 3 animales por grupo, en estado de reposo (condiciones basales) y durante la administración de distintos fármacos dirigidos a bloquear la actividad mitocondrial. Este protocolo permitió substraer y cuantificar a partir de las medidas de OCR los distintos parámetros que resumen el perfil bioenergético de la célula (**Figura 30 A** para los cultivos P30 y **Figura 30 B** para los P120). En los cultivos celulares, tras analizar el consumo de oxígeno basal, se aplicó rotenona (0,5 μ M) para bloquear el complejo I mitocondrial e inferir de esta manera el consumo de oxígeno derivado de la producción de ATP en las células. Posteriormente, con la aplicación de FCCP (2 μ M) analizamos la respiración máxima, provocada por la disipación del potencial de membrana mitocondrial. Por último, con la coadministración de oligomicina (1 μ M) /antimicina A (0,5 μ M) registramos el consumo de oxígeno derivado de la respiración no mitocondrial. A partir de estas medidas, podemos calcular el resto de parámetros complementarios que definen el perfil bioenergético celular como la fuga de protones, o la capacidad de reserva respiratoria.

Debemos destacar los valores que se vieron estadísticamente afectados en nuestro modelo de ELA, y su evolución con la patología. Se caracterizó un déficit significativo en los parámetros de respiración máxima (41,2 % menor a P30, ** $p < 0,01$ y 24,7 % menor a P120, *** $p < 0,001$), en la capacidad respiratoria de reserva (16,5 % menor a P30, * $p < 0,05$ y 37,4 % a P120, * $p < 0,05$), y en el consumo de oxígeno no mitocondrial (44 % menor a P30, *** $p < 0,001$ y 59,7 % a P120, *** $p < 0,001$). Estos parámetros, se incrementaron de forma fisiológica con la edad, si comparamos los controles a P120 con P30, y la alteración del ratón transgénico fue más significativa a la edad sintomática que en la presintomática. Los análisis cuantitativos de

estos valores, se recogen en las gráficas de barras de la **Figura 30 C** y resultado numérico de todos estos valores se resumen en la **Tabla 15**.

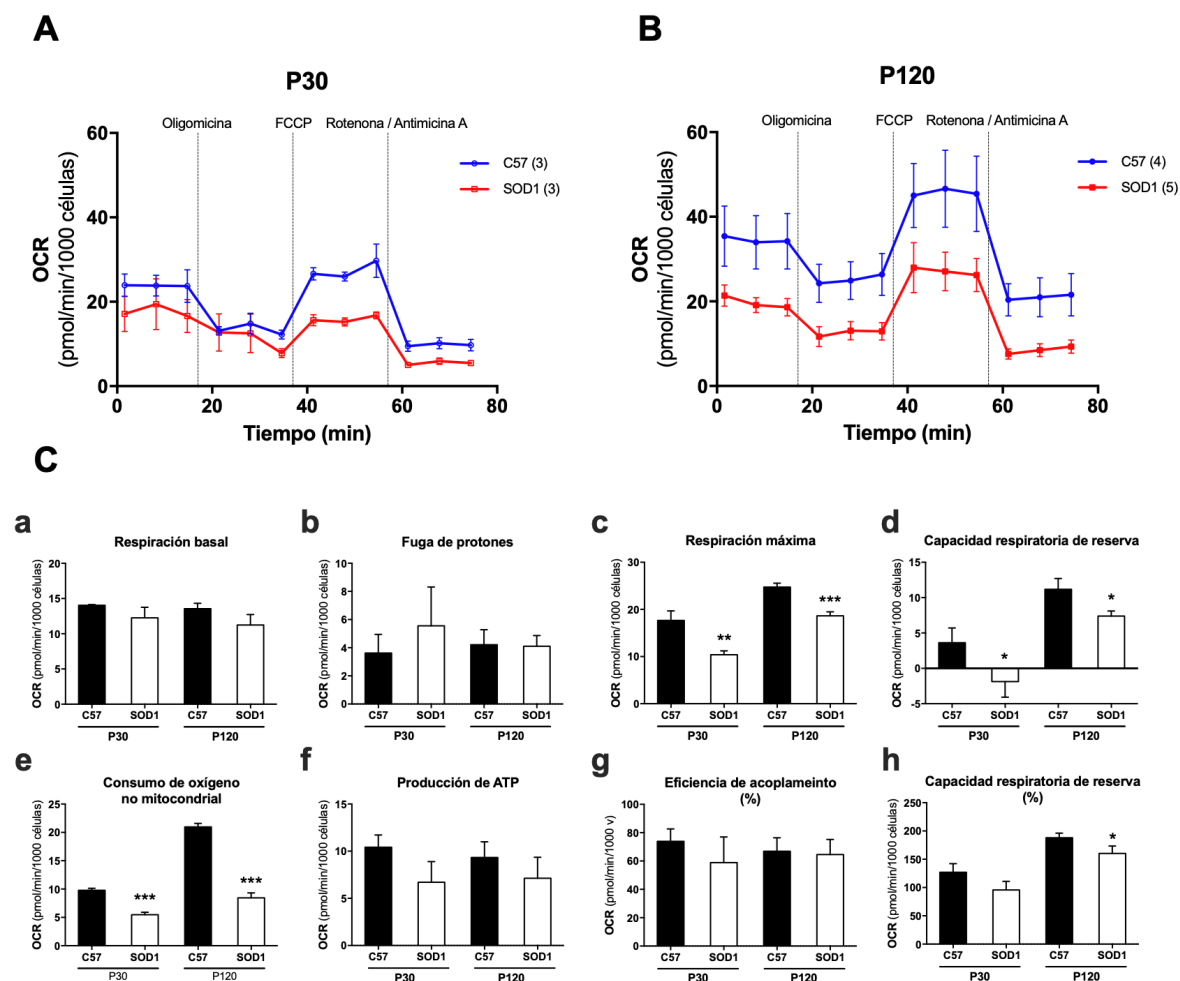


Figura 30. Alteración del perfil bioenergético en la célula cromafín del ratón SOD1^{G93A}. El perfil bioenergético se analizó en cultivos primarios de CC de ratones control (C57, línea azul) y ratones transgénicos (SOD1, línea roja), mediante un equipo Seahorse XFp analyzer. Se realizó un test de estrés mitocondrial a edad presintomática P30 (**A**) y sintomática P120 (**B**), analizando el consumo de oxígeno mitocondrial (OCR) durante la aplicación secuencial de cuatro fármacos dirigidos a la mitocondria: oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina A. Este procedimiento nos permitió analizar los siguientes parámetros mostrados en **C**: **a**, respiración basal; **b**, fuga de protones; **c**, respiración máxima; **d**, capacidad respiratoria de reserva; **e**, consumo de oxígeno no mitocondrial; **f**, producción de ATP; **g**, eficiencia de acoplamiento; y **h**, capacidad respiratoria de reserva en %. Las barras representan la media \pm el error estándar de al menos 3 cultivos. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ *t* de Student despareado, comparado con el control a su misma edad.

Tabla 15. Cuantificación de los parámetros obtenidos a partir de la medida de OCR en cultivos de CC de ratones control y SOD1 a edad presintomática y sintomática.

	P30		P120	
	C57	SOD1	C57	SOD1
Respiración basal	14,04 ± 0,053	12,26 ± 0,86	13,55 ± 0,45	11,24 ± 0,86
Fuga de protones	3,62 ± 0,76	5,55 ± 1,59	4,22 ± 0,61	4,11 ± 0,43
Respiración máxima	17,67 ± 1,16	10,39 ± 0,47 **	24,74 ± 0,48	18,63 ± 0,50 ***
Capacidad respiratoria de reserva	3,63 ± 1,20	-1,87 ± 1,27 *	11,18 ± 0,88	7,39 ± 0,42 *
Consumo de oxígeno no mitocondrial	9,78 ± 0,21	5,47 ± 0,25 ***	20,98 ± 0,352	8,46 ± 0,50 ***
Producción de ATP	10,42 ± 0,75	6,71 ± 1,26	9,34 ± 0,96	7,14 ± 1,28
Eficiencia de acoplamiento (%)	73,89 ± 5,02	58,85 ± 10,44	66,85 ± 5,49	64,51 ± 6,16
Capacidad respiratoria de reserva (%)	127 ± 8,81	95,74 ± 8,77	188 ± 4,72	160,3 ± 7,60 *
Media ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. t de Student respecto a C57				

5. RELACIÓN hSOD1^{G93A} Y MITOCONDRIA

5.1. La enzima mutada SOD1^{G93A} se localiza en la mitocondria y su colocalización se triplica durante el desarrollo de la enfermedad

La naturaleza de nuestro modelo de enfermedad de ELA, es la de una proteinopatía causada por la mutación en la proteína humana SOD1. Una vez descrita la expresión de esta proteína en la célula cromafín, y tras caracterizar la alteración mitocondrial tanto a nivel de ultraestructura como de función, nos propusimos explorar la interacción de la proteína con este orgánulo. Para ello se realizaron experimentos de inmunofluorescencia en cultivos de CC de ratones SOD1 P30 y P120, marcando las mitocondrias con MitoTracker Red y la enzima mutada con el anticuerpo C4F6 anti SOD1-humana mutada (**Figura 31 A,B**). Mediante microscopía confocal realizamos reconstrucciones tridimensionales de las células marcadas para tener una imagen clara de la localización de la enzima mutada en la célula y su posible interacción con la mitocondria. Se observó un patrón de marcaje de la enzima mutada en forma de puntos distribuidos por todo el citosol, con algunas inclusiones nucleares. Al analizar la colocalización con las mitocondrias, observamos que la señal verde de la enzima mutada colocalizaba en un $4,5 \pm 0,8$ % con la señal roja de mitocondrias, normalizado al total de la señal mitocondrial. Este valor de colocalización cuantificado a P30, se observó casi triplicado con el desarrollo de la enfermedad, llegando a alcanzar valores de $10,9 \pm 1,1$ % a P120 (**Figura 31 C**).

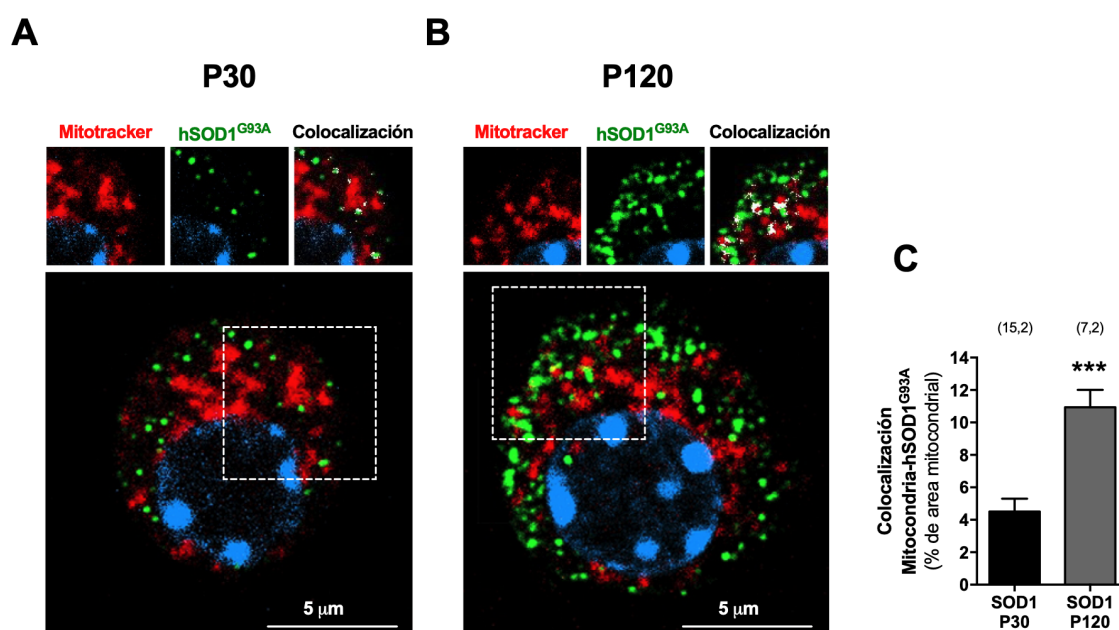


Figura 31. Colocalización de la proteína mutada hSOD1^{G93A} con la mitocondria durante la instauración de la enfermedad: Imágenes de microscopía confocal mostrando un plano medial de una célula cromafín fijada y marcada con mitotracker red (mitocondrias, rojo) anti hSOD1^{G93A} (enzima SOD1 humana mutada, verde) y DAPI (núcleo, azul) a etapa presintomática (A) y sintomática (B). Encima de cada imagen se muestra la ampliación de la zona marcada con un cuadrado punteado en blanco y separadas las señales de la fluorescencia de la mitocondria, de la enzima mutada, y por último, la superposición de ambas imágenes mostrando en blanco las áreas de colocalización. C, cuantificación de la colocalización hSOD1^{G93A}-mitocondrias en porcentaje, normalizado con respecto al área de la señal de mitocondrias. Las barras representan la media \pm el error estándar del número de células y cultivos mostrados entre paréntesis. Análisis estadístico mediante test Mann-Whitney, *** $p < 0,001$.

Para confirmar la localización de la enzima mutada a nivel mitocondrial, se realizó una inmuno-oro en los cortes finos de tejido de médula adrenal, que también utilizamos para la caracterización de la ultraestructura mitocondrial. Utilizamos el anticuerpo contra la SOD1 humana mutada como anticuerpo primario, y como secundario un anticuerpo conjugado con una partícula de oro de 10 nm de tamaño. La realización de estos experimentos nos permitió describir la presencia de nanopartículas de oro, revelando la localización de la enzima en las mitocondrias tanto en las muestras de ratones SOD1 a P30 (**Figura 32 A,B**) como a P120 (**Figura 32 C,D**). Con el objeto de estudiar su localización exacta en la mitocondria, hemos cuantificado las nanopartículas en los distintos compartimentos mitocondriales a la edad de P120, pero también se observaron en las mismas localizaciones a P30. Estas nanopartículas se observaron a nivel de espacio intermembrana ($110,9 \pm 37,0$ partículas/ μm^2), de la matriz mitocondrial ($24,9 \pm 5,5$ partículas/ μm^2) y en las crestas ($51,8 \pm 32,6$ partículas/ μm^2), demostrando que la enzima hSOD1^{G93A} presenta una localización mitocondrial a pesar de su naturaleza citosólica (la media de partículas de oro en SOD1^{G93A} a edad sintomática fue de $35,0 \pm 21,8$ partículas/ μm^2 en la mitocondria frente a $412,7 \pm 76,2$ partículas/ μm^2 en el citosol).

En el análisis de las imágenes caracterizamos también otras zonas de localización de la enzima mutada, como el retículo endoplásmico en donde vimos una acumulación importante, en el núcleo y en diferentes tipos de gránulos (**Figura 32 E,F**). También observamos acúmulos de partículas de oro que muestran varias unidades enzimáticas agrupadas. Estos acúmulos se encontraron principalmente en el citosol.

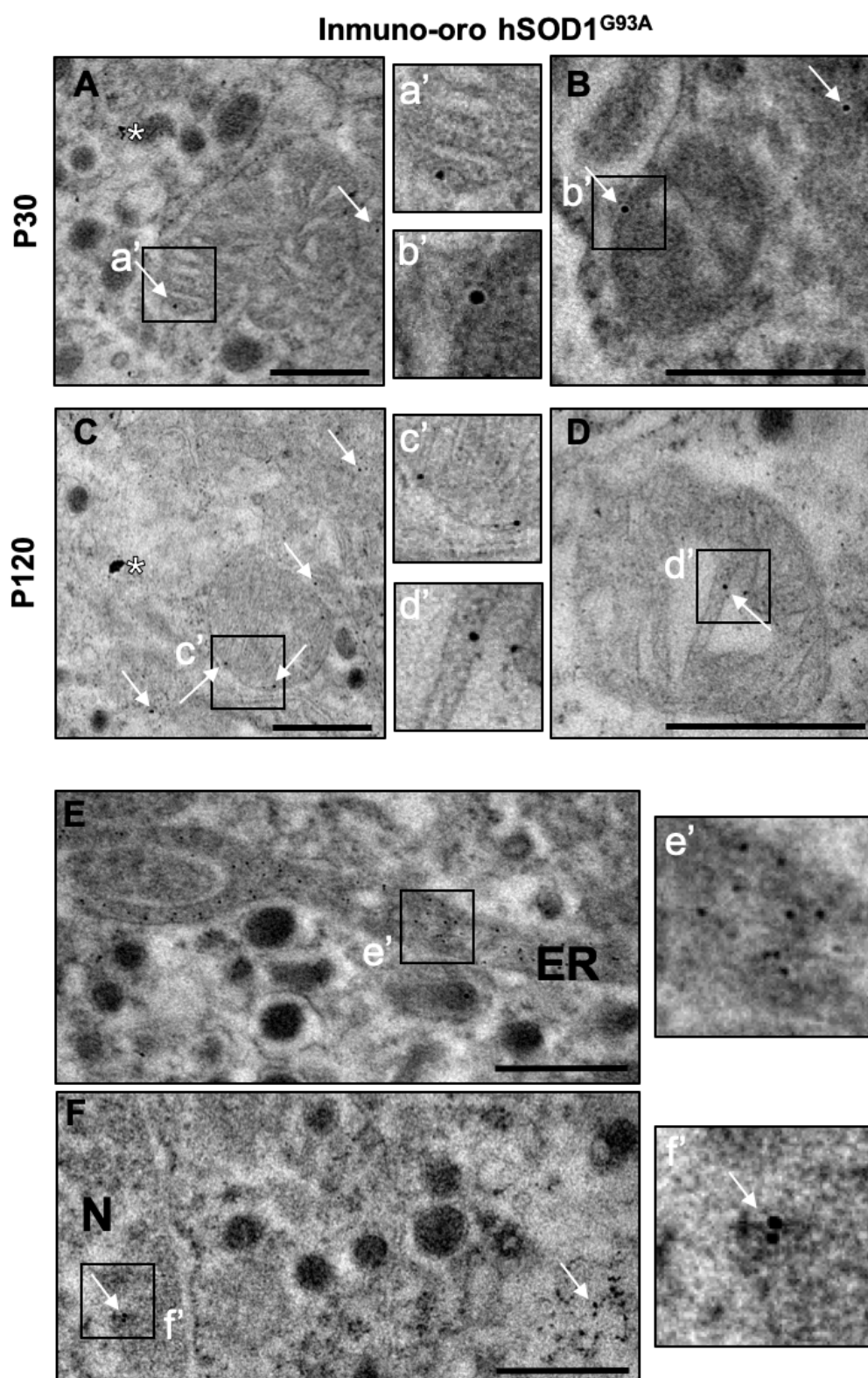


Figura 32. Localización subcelular de la enzima mutada hSOD1^{G93A}. Para localizar la enzima mutada en la CC, se realizó una inmuno-oro con el anticuerpo C4F6 anti-hSOD1^{G93A} en cortes de médula adrenal de ratones SOD1 a edad presintomática (P30, A, B) o sintomática (P120, C, D) seguido de un anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro de 10 nm. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión que muestran en detalle mitocondrias de las células cromafines, con la ampliación de las zonas reactivas al anticuerpo (partículas de oro señaladas con flechas, a', b', c', d', e', f'). Otras localizaciones de la proteína mutada en la CC son: E, retículo endoplásmico liso (ER), que muestra una gran acumulación de partículas; F, dentro del núcleo (N). Las agregaciones de proteína hSOD1^{G93A} están señaladas con un asterisco (A, C), localizadas mayoritariamente en el citosol. Escala = 500 nm

6. ESTUDIO DE EXPRESIÓN PROTEICA

6.1. La proteína OPA1, clave en la fusión mitocondrial, está disminuida en la CC del ratón SOD1^{G93A}

El desbalance de la dinámica mitocondrial en la CC de los ratones SOD1^{G93A} observado en el análisis de imagen, se exploró a través de la expresión de una proteína clave en la fusión mitocondrial, la OPA1. Esta proteína se encuentra en la membrana interna mitocondrial, ejerciendo un papel imprescindible para completar la fusión entre dos mitocondrias, pero también para mantener la estructura de las crestas mitocondriales. Para una correcta función de la proteína OPA1 el procesamiento de escisión proteolítica de la proteína en sus isoformas larga (L-OPA1) y corta (S-OPA1) está finamente regulado, puesto que cada isoforma se dispone de manera específica en la mitocondria para ejercer su función. A la vista de las alteraciones mitocondriales descritas anteriormente, se cuantificó mediante *western blot* la expresión global de esta proteína. Las dos bandas obtenidas en la inmunodetección con el anticuerpo anti-OPA1 se corresponden a cada una de las isoformas: la de cadena larga (L-OPA1) sería la situada en la parte superior, por su menor movilidad en agarosa durante la electroforesis, y la de cadena corta (S-OPA1) sería la inferior, ya que al ser más pequeña difunde a mayor velocidad (**Figura 33 A**). La expresión global de la proteína OPA1 (analizando en conjunto las dos isoformas, en 4 ratones por cada grupo), fue significativamente menor en la médula adrenal del ratón SOD1^{G93A} a las dos edades respecto al control a su misma edad (25 % y 36 % menor a P30 y P120 respectivamente, **Figura 33 B**). Si comparamos lo que ocurre durante el desarrollo fisiológico del ratón control, vemos una pequeña disminución con la edad, aunque no es significativa.

Cuando nos fijamos en el balance entre las dos isoformas, se observó un interesante cambio en la isoforma mayoritaria con la edad, siendo mayoritaria en ambos grupos a edad presintomática la isoforma L-OPA1 y a edad sintomática la isoforma S-OPA1 (**Figura 33 C**). Se analizó el cociente S-OPA1/L-OPA1 que fue <1 a P30 mientras que a P120 su valor fue >1 (**Figura 33 D**). Esta evolución de las isoformas con la edad no presentó diferencias entre los grupos C57 y SOD1 ($0,97 \pm 0,04$ y $0,92 \pm 0,06$ a P30, $1,37 \pm 0,08$ y $1,3 \pm 0,07$ a P120).

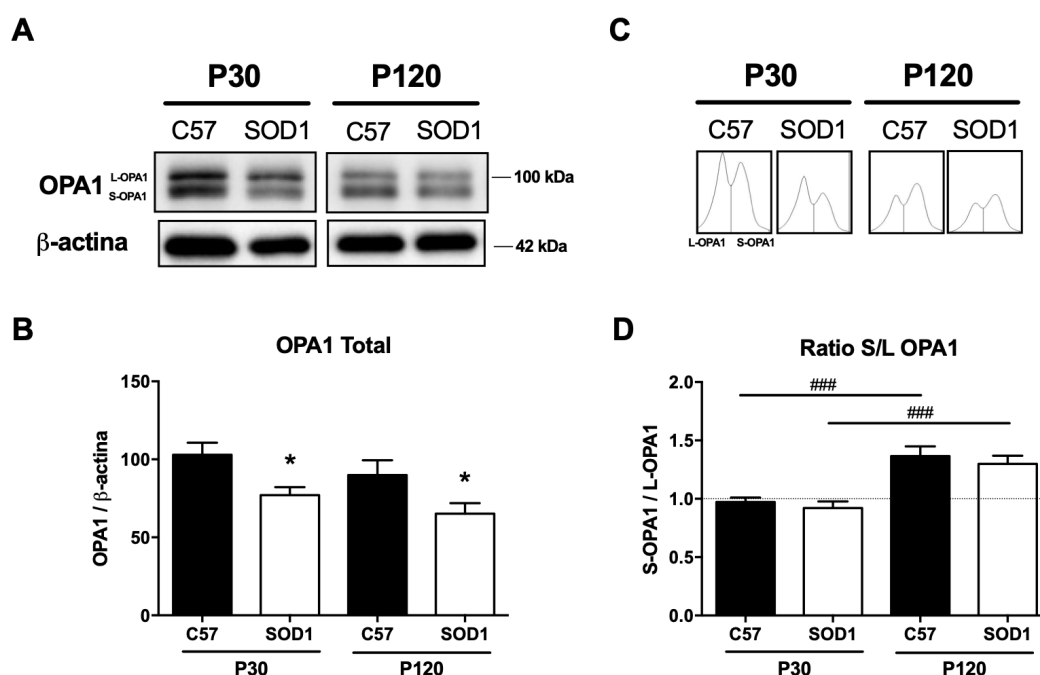


Figura 33. Disminución de la expresión global de la proteína OPA1 en la médula adrenal del ratón $SOD1^{G93A}$ desde estadios presintomáticos, con cambios en su procesamiento proteolítico relacionado con la edad. Los niveles de expresión de proteína OPA1 se midieron mediante la técnica de *western blot* en muestras de médula adrenal. **A**, inmunotransferencia representativa para la proteína OPA1 y β -actina en muestras de ratón control (C57) y transgénico (SOD1) a edad presintomática (P30) y sintomática (P120). **B**, análisis cuantitativo de la expresión de la proteína calculado como el cociente entre la densidad de la proteína total y su correspondiente banda de β -actina, que se utilizó como control de carga ($n=4$, test Mann-Whitney desapareado, $*p < 0.05$ respecto al control C57 a la misma edad). **C**, representación gráfica de la densidad óptica de cada banda individual analizada en **A**, donde el primer pico corresponde a la isoforma de la proteína de mayor peso molecular (L-OPA1) y el segundo a la de menor (S-OPA1). **D**, análisis cuantitativo de la relación del grado de expresión relativo de ambas isoformas (calculado como S-OPA1 / L-OPA1). Las barras representan la media \pm el error estándar de al menos 4 animales. $***p < 0.001$ relativo a los datos a P30.

6.2. Las proteínas ubiquitinadas en la médula suprarrenal están disminuidas en el modelo SOD1, mientras que la proteína Bax no cambia su expresión

El estudio del sistema ubiquitín-proteasoma para conocer el estado de la principal vía de eliminación de proteínas aberrantes o dañadas es importante para entender qué está ocurriendo en nuestro modelo de ELA durante el desarrollo de la enfermedad. Para hacer una estimación del proceso global, se analizó de forma genérica el total de proteínas mono- y poli-ubiquitinadas. Para ello se extrajeron las proteínas totales de muestras de médula adrenal, se separaron por electroforesis en un gel SDS-PAGE y las transferimos a una membrana que incubamos posteriormente con el anticuerpo FK2 (**Figura 34 A**). Este anticuerpo permite la inmunodetección del total de proteínas ubiquitinadas, lo que nos da una idea del estado de recambio proteico celular. La inmunorreactividad mostró una reactividad generalizada en

todo el carril, que fue menor en las muestras SOD1 comparado con las C57 (24 % menos a P30 y 22 % menos a P120), aunque la diferencia solo fue estadísticamente significativa a la edad sintomática (* $p < 0.05$, **Figura 34 B**). Esto puede ser explicado desde una menor ubiquitinación de proteínas en el ratón transgénico, que implicaría la menor degradación de proteínas; o desde una mayor actividad del proteasoma lo que está evitando la acumulación de proteínas ubiquitinadas.

También nos propusimos estudiar si existen cambios en la expresión de la proteína proapoptótica Bax, de la que se ha sugerido que hSOD1^{G93A} puede inducir su activación a través de Bcl-2, iniciando una ruta de apoptosis mediada por caspasas. Realizamos experimentos de western blot en proteína total de médula adrenal (n=8) (**Figura 34 C**) y a pesar de encontrar menores niveles de expresión con la edad y con la enfermedad, no encontramos diferencias significativas con respecto a los controles, incluso a edad sintomática (**Figura 34 D**).

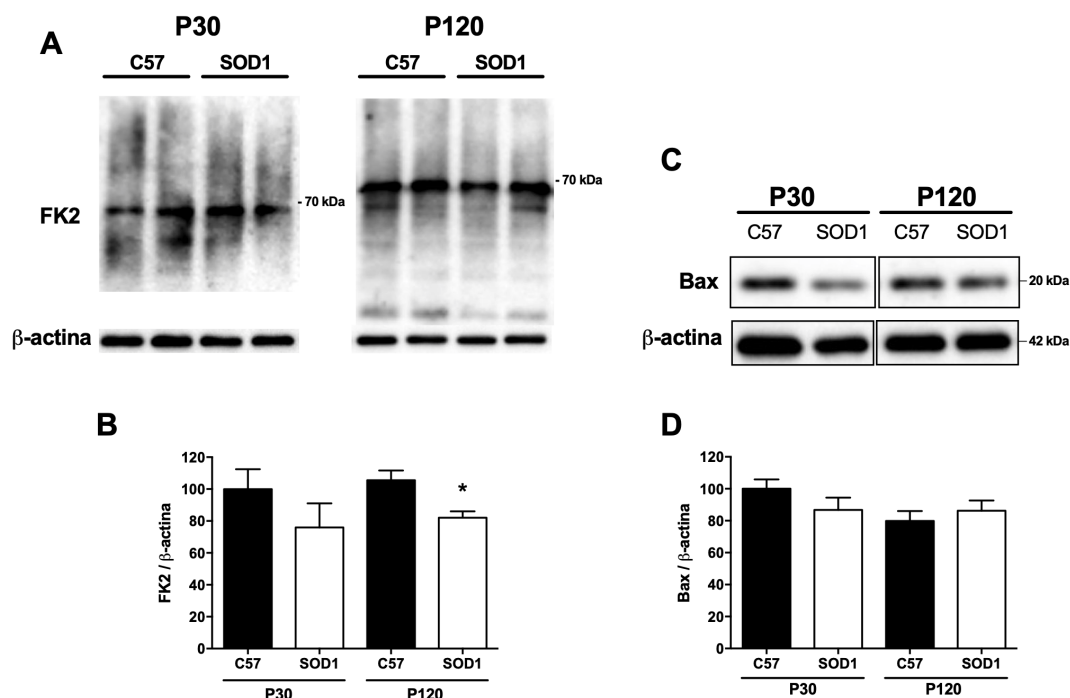


Figura 34. Proteínas ubiquitinadas y expresión de Bax. El total de proteínas mono- y poli-ubiquitinadas se analizó con el anticuerpo FK2 en proteína total extraída de médula adrenal, separadas en gel de poliacrilamida al 12 %. **A**, inmunotransferencia representativa en muestras de ratón control (C57) y transgénico (SOD1) a edad presintomática (P30) y sintomática (P120). **B**, análisis cuantitativo del total de proteínas ubiquitinadas calculado como el cociente entre la densidad óptica del conjunto de proteínas y su correspondiente banda de β-actina (test Mann-Whitney desapareado, * $p < 0.05$ respecto a C57 a P120). **D**, inmunotransferencia representativa para la proteína Bax. **C**, análisis cuantitativo de la expresión de la proteína Bax calculado como el cociente entre la densidad de la proteína y su correspondiente banda de β-actina. El análisis de la inmunorreactividad de Bax normalizado a la de β-actina. Las barras representan la media \pm el error estándar de al menos 4 animales.

DISCUSIÓN

1. El daño en la ultraestructura mitocondrial, el primer evento descrito en ELA, también se presenta en las células cromafines de los ratones SOD1^{G93A}

Entre los primeros eventos descritos en las neuronas motoras de los ratones con las mutaciones G93A y G37R en la enzima SOD1 y que desarrollan la ELA, está el gran número de pequeñas vacuolas observadas en el entorno de la membrana (Dal Canto and Gurney, 1994, Wong et al., 1995, Kong and Xu, 1998). Estas vacuolas de pequeño tamaño (70-150 nm) derivan de mitocondrias dilatadas y del retículo endoplásmico y contienen componentes celulares dañados. Las causas que producen este fenómeno se atribuyeron a la “toxicidad adquirida” de la enzima mutada. Concretamente, la enzima puede existir en conformaciones no nativas, resultantes de un plegamiento inadecuado (debido a la mutación) o de modificaciones post-transduccionales anómalas (oxidación) (Pickles and Vande Velde, 2012). La potencia tóxica de la proteína es intrínseca a su conformación adquirida (Dal Canto and Gurney, 1994, Pickles and Vande Velde, 2012); por tanto, dependiendo de la capacidad de la mutación adquirida, su toxicidad podrá guardar cierta dependencia de la concentración (Deitch et al., 2014). Además, la localización subcelular de la proteína mutada puede estar relacionada con la gravedad de la enfermedad (Jaarsma et al., 2000). Lo más interesante es que el mal plegamiento de la estructura cuaternaria no es solo específico de la proteína SOD1, pudiendo acontecer en otras proteínas como FUS, TDP43 o C9orf72, teniendo como premisa para el desarrollo de la enfermedad la necesidad de alterar la ultraestructura y funcionalidad de las mitocondrias (para una revisión, ver (Smith et al., 2017)).

En nuestro estudio en células cromafines del ratón mutado SOD1^{G93A}, hemos querido determinar si existen estas aberraciones mitocondriales como las descritas previamente en estudios ultraestructurales en neuronas motoras (Kong y Xu, 1998; Bendotti et al., 2001; Jaarsma et al., 2001). Así, en la célula cromafín hemos observado, ya desde edades presintomáticas, la formación de pequeñas vesículas derivadas de mitocondrias (**Figura 22 Ba**). Además, otros cambios destacables que hemos visto son la presencia de crestas dilatadas y desorganizadas (**Figura 22 Ba-g**), evaginaciones de la membrana mitocondrial externa (**Figura 22 Bd**), roturas de la membrana externa mitocondrial (**Figura 22 Bbc**), y la formación de mitofagosomas que aún contienen restos de mitocondrias en su interior (**Figura 22 Bh**). Como en las motoneuronas, las vacuolas se forman a partir de un hinchamiento progresivo del espacio intermembrana. La expansión de la membrana mitocondrial externa acaba por

formar vacuolas grandes, e inducir el colapso de la membrana interna (Higgins et al., 2003; Xu et al., 2004). Además de eso, hay que destacar que también hemos observado el hinchamiento de la membrana mitocondrial interna en un proceso similar al anterior (**Figura 22 Ba-c,e,g**), así como el hinchamiento y vacuolización de la matriz de la cámara mitocondrial interna (**Figura 22 Be-g**).

2. La alteración del sistema MICOS afecta a la ultraestructura de las uniones de cresta

La membrana mitocondrial interna está distribuida en dos dominios de membrana que difieren en su topología y composición de proteínas. La zona íntimamente relacionada con la MME alberga la mayoría de las proteínas transportadoras mientras que sus plegamientos, formando las crestas, contienen principalmente el complejo proteico del sistema OXPHOS y la F₁F_o-ATP sintasa. Ambos dominios de membrana se conectan a través de las uniones de cresta, que mantienen la composición proteica asimétrica y limitan la difusión de componentes entre sí. La forma de las uniones de cresta está regulada por un complejo proteico multioligomérico, conocido como el sistema organizador de las crestas (MICOS) (Rampelt et al., 2017b).

En nuestro estudio hemos observado que mientras en el ratón control la apertura de las uniones de cresta no eran mayores de 13 nm, en las mitocondrias de la célula cromafín de los ratones SOD1^{G93A} era de más de 20 nm a edades pre-sintomáticas, y aumentaban a más de 40 nm a edades sintomáticas (**Figura 25**), guardando una relación con la progresión de la enfermedad. Estas aperturas del tamaño de las uniones de cresta evidencian una alteración en el sistema MICOS. Entre los posibles factores conocidos que pueden desestabilizar MICOS, hay que destacar la alteración en sus proteínas reguladoras, como por ejemplo la chaperona Hsp70 (Ioakeimidis et al., 2014) o la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1) (Darshi et al., 2011, Glytsou et al., 2016). Otro factor importante es la peroxidación por ROS de la cardiolipina, el principal fosfolípido que forma las membranas de las uniones de cresta (Horvath and Daum, 2013) y cuya oxidación provoca la pérdida del anclaje de MICOS (Shidoji et al., 1999, Horvath and Daum, 2013), un hecho que se sabe que sucede en el ratón mutado SOD1^{G93A} (Kirkinezos et al., 2005). Las consecuencias de la alteración de MICOS por medio de estos mecanismos se reflejan en la fusión mitocondrial alterada y la fragmentación de las crestas (Darshi et al., 2011, Bohnert et al., 2015), que a su vez conduce a deficiencias en la respiración mitocondrial.

Hechos que, como veremos posteriormente, también hemos observado en las células cromafines del ratón SOD1^{G93A}.

Por último, cabe comentar que las aperturas de las uniones de crestas en la magnitud que hemos observado, acompañadas de la peroxidación de la cardiolipina, puede hacer que ciertas proteínas de gran peso molecular como el citocromo-c, se pueda liberar al espacio intermembrana, en donde puede generar ROS e iniciar rutas de apoptosis (Kirkinezos et al., 2005). Nosotros hemos estudiado el grado de expresión de Bax, una proteína que regula la apoptosis a través de liberación de citocromo-c y activación de caspasas, y no hemos observado cambios en su expresión (**Figura 34 D**). Aunque no descartamos que el citocromo-c pueda liberarse, la observación mediante TEM de determinadas alteraciones en la ultraestructura mitocondrial como la pérdida de su contenido, la presencia de vacuolización, o la liberación de ribosomas al citoplasma por parte del retículo endoplásmico rugoso nos puede sugerir que la muerte de la célula se produce por necrosis (Morrice et al., 2017, Napoletano et al., 2019), un tipo de muerte celular que ya ha sido sugerida en ELA (Morrice et al., 2017).

3. La alteración en las uniones de cresta y del sistema MICOS tiene como consecuencia la afectación del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m)

Nosotros hemos realizado la medida del Ψ_m mediante el uso de la sonda catiónica TMRE, que presentará una mayor difusión hacia la mitocondria en función de su diferencia de potencial. Hemos observado que en el ratón mutado SOD1^{G93A} existe un menor gradiente electroquímico mitocondrial, ya desde edades presintomáticas (**Figura 27**).

La explicación más razonable de esta alteración en el Ψ_m podría darse debido a la estrecha relación que existe entre la integridad de la ultraestructura de las crestas mitocondriales y su actividad funcional, a través del sistema MICOS (Mannella, 2006, Rampelt et al., 2017b, Quintana-Cabrera et al., 2018). Algunos factores en la alteración del sistema MICOS como los comentados anteriormente, pueden estar detrás de la despolarización mitocondrial. Los cambios que acontecen en la ultraestructura mitocondrial producen un aumento de la actividad de los transportadores iónicos y de los canales de la membrana mitocondrial interna que provocan hinchamiento mitocondrial, y en consecuencia afectan al Ψ_m (O'Rourke et al., 2005). Además, la apertura de las uniones de cresta produce la difusión de proteínas, metabolitos o iones hacia el espacio intermembrana, aumentando la osmolaridad

y el hinchamiento (Griparic et al., 2004, Frezza et al., 2006). Por lo tanto, la morfología de las crestas mitocondriales determina la eficiencia de la respiración, afectando así al Ψ_m (Cogliati et al., 2016).

4. Las alteraciones en el Ψ_m , la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva, evidencian la ineficiencia de OXPHOS

En nuestro trabajo, hemos observado una pérdida del Ψ_m basal en las células cromafines de los ratones SOD1^{G93A} (**Figura 27**). Es lógico pensar que si la célula tiene un Ψ_m basal bajo, tratará de evitar: i) la fuga de protones, para tratar de mantener su fuerza protón motriz (ver **Figura 30 Cb**); ii) intentará mantener su eficiencia de acoplamiento (ver **Figura 30 Cg**); y iii) tratará de aportar poder reductor en forma de NADH y FADH a los complejos mitocondriales para tratar de mantener el gradiente protón motriz. Este poder reductor lo obtendrá del ciclo de los TCA, y a través de las lanzaderas como la malato/aspartato o la succinato/fumarato, ya que estos sustratos no dependen tanto del Ψ_m para su entrada en la mitocondria. Por lo tanto, la célula cromafín mantiene tanto la respiración basal (**Figura 30 Ca**) como la producción de ATP (**Figura 30 Cf**) en valores similares a los del ratón control, pero a consecuencia de un gasto excesivo de sustratos metabólicos. Es decir, con una respiración ineficiente. Esto se evidencia todavía más cuando sometemos a la célula a un colapso del Ψ_m en presencia de FCCP. Es estas condiciones, se obliga a la mitocondria a aumentar el consumo de oxígeno hasta su máximo, para intentar compensar la pérdida del gradiente protón motriz a través del incremento del transporte de electrones. Aquellos sustratos como el ADP que ya estaban comprometidos, y que se transportan a través de los transportadores de nucleótidos de adenina (ANT), no podrán transportarse al ser dependientes del Ψ_m . Es decir, el ratón mutado SOD1^{G93A} tendrá una mayor dependencia que el ratón control por ese tipo de sustratos, debido a su deficiencia en el Ψ_m basal. Por este motivo, observamos alteraciones en la respiración máxima (**Figura 30 Cc**), y en la capacidad respiratoria de reserva (**Figura 30 Cd**), ya que son dependientes del Ψ_m , y en consecuencia, se observa un descenso en la generación de ATP dependiente de OXPHOS. Es importante destacar que la necesidad que tiene el ratón mutado de obtener poder reductor hace que su metabolismo sea ineficiente, necesitando un alto consumo de glucosa, proteínas y grasas para mantener el aporte de NADH y FADH. Esta puede ser una de las explicaciones por las que los ratones mutados SOD1^{G93A}

pierden peso con el transcurso de la enfermedad (**Figura 18**). Cabe también comentar que la célula cromafín tiene una naturaleza más glicolítica que oxidativa, en donde un 20 % del consumo de glucosa es por la glicólisis y un 30 % para formación de lactato, asemejándose más su metabolismo a una célula glial que neuronal (Millaruelo et al., 1986).

Además, si observamos los cambios que se producen fisiológicamente en la respiración mitocondrial con la edad, en el ratón control se incrementa la capacidad respiratoria máxima y su capacidad respiratoria de reserva. Esto puede estar relacionado con la madurez mitocondrial y celular, reflejada en la mayor fusión y tamaño que se observa en las mitocondrias (**Figura 23 A,C,F**). Por el contrario, en el ratón mutado SOD1^{G93A} aunque su capacidad respiratoria máxima (**Figura 30 Cc**) y de reserva (**Figura 30 Cd**) se incrementan con la edad, lo hace a través del incremento del número de mitocondrias de pequeño tamaño (**Figura 23 E,F**). Pero estas capacidades respiratorias están siempre disminuidas en relación al ratón control.

Aunque existen muchos trabajos que describen alteraciones en los complejos respiratorios mitocondriales tanto en humanos (Borthwick et al., 1999, Wiedemann et al., 2002) como en modelos murinos (Mattiazzi et al., 2002), nuestros resultados sugieren que en la célula cromafín las alteraciones que se producen en OXPHOS son consecuencias principalmente de la pérdida del Ψ_m por defectos en MICOS.

5. El desequilibrio en el sistema OXPHOS, la ganancia tóxica de función de SOD1G93A y la alteración en la homeostasia redox son los principales mecanismos de generación de radicales libres

Aunque existen muchas fuentes de ROS, en las células cromafines del ratón SOD1^{G93A} se puede explicar su generación incrementada en relación al control (**Figura 29**) por cuatro mecanismos principales: i) desbalance en el sistema de la OXPHOS; ii) toxicidad de la proteína SOD1^{G93A} mal plegada; iii) afectación de las enzimas que regulan la homeostasia redox; y iv) otras enzimas que generan ROS. A continuación, discutiremos la importancia de estos mecanismos en base a nuestros resultados.

i) Desbalance en el sistema de OXPHOS

En condiciones normales, entre un 2-6 % del consumo de oxígeno genera aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Estos se generan a través de la fuga de electrones que se produce en la cara

expuesta hacia la matriz mitocondrial entre los complejos I (Miwa and Brand, 2003) y III (St-Pierre et al., 2002), que pueden producir por medio de la ubiquinona una reacción de transferencia de electrones al oxígeno, produciendo $O_2^{\cdot-}$ (Sena and Chandel, 2012). Debido a su origen en la cadena de transporte de electrones, la producción de ROS mitocondrial se correlaciona estrechamente con el Ψ_m . Cuando el Ψ_m es alto se produce un enlentecimiento del flujo de electrones lo que favorece la producción de ROS. A su vez, el incremento de ROS puede regularse mediante el desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico por medio de varios mecanismos: i) la disipación del gradiente de protones a través de las proteínas desacoplantes (UCP₁₋₅) conocido como “fuga de protones”; ii) mediante el “*slip*” o variación estequiométrica H^+ :electrón, lo que provoca un mayor transporte de H^+ por cada electrón. Esta pérdida del Ψ_m hace que la reacción final de transferencia de electrones para la formación de ATP, CO_2 y H_2O sea termodinámicamente más espontánea, y minimiza su pérdida asociada a la producción de ROS (Brand, 2000). Por otra parte, los factores fisiológicos como la edad hacen que la OXPHOS se vaya desacoplando, generándose más ROS (podemos observarlo si comparamos la **Figura 29** de producción de ROS a ambas edades del ratón). Sin embargo, en las condiciones patológicas que hemos observado en las células cromafines del ratón mutado SOD1^{G93A} se produce una disminución del Ψ_m (**Figura 27**), sin producirse una alteración en la “fuga de protones” (**Figura 30 Cb**), ni tampoco en la eficiencia de acoplamiento (**Figura 30 Cg**), posiblemente por la necesidad que tiene la célula de mantener el gradiente protón motriz. Como explicábamos anteriormente, la célula va a requerir un aporte extra de poder reductor a través de NADH y FADH que serán utilizados para mantener el gradiente protón motriz y se incorporarán al complejo I y II respectivamente, provocando un incremento en la producción de ROS como consecuencia del mantenimiento de OXPHOS en condiciones de pérdida del Ψ_m (Plecita-Hlavata and Jezek, 2016).

ii) Toxicidad de la proteína SOD1^{G93A} mal plegada

Está descrito que los cationes metálicos acomplejados por la enzima SOD1 pueden sufrir reacciones de oxido-reducción que provoquen la generación de $O_2^{\cdot-}$ (Estevez et al., 1999). Además se sabe que la enzima puede liberar éstos metales de transición, que pueden catalizar por si mismos la formación de ROS (reacción de Fenton) (Valentine et al., 2005). Por último, el mal plegamiento y su agregación hace que adquiera propiedades tóxicas relacionadas con la generación de estrés oxidativo (Bosco et al., 2010).

iii) Afectación de las enzimas que regulan la homeostasia redox

Las células tienen principalmente tres sistemas de defensa antioxidante: el sistema de glutathione, las enzimas catalasa y la SOD1 (Stanton, 2012). En nuestro estudio hemos observado que la mutación SOD1^{G93A} produce un mal plegamiento y agregación, con una pérdida de funcionalidad para la defensa frente a O₂⁻. Es importante destacar que todas estas enzimas mencionadas del sistema de defensa antioxidante dependen del NADPH para reducirse, que principalmente procede del ciclo de las pentosas fosfato (la SOD1 necesita para recuperar su actividad de la acción de la catalasa que es dependiente de NADPH). Ésta ruta metabólica es de gran relevancia en la célula cromafín, estando en condiciones normales hasta 5 veces incrementada en relación al sistema nervioso (Sochor et al., 1984, Millaruelo et al., 1986). Esto se debe a las elevadas necesidades metabólicas que tienen estas células para la síntesis de proteínas contenidas en sus vesículas de secreción (Maker et al., 1976). Sin embargo, la sobreexpresión de SOD1^{G93A} puede disminuir la producción de NADPH en un 20 % (Kirby et al., 2005), lo que conlleva una pérdida de la funcionalidad de estas enzimas por falta de sustrato metabólico. En ese mismo trabajo, se estudió el efecto de la SOD1 mutada en la expresión génica sobre la línea celular neuronal NSC34. Los autores encontraron una alteración en 268 genes, con un marcado descenso de 187, por lo que sugieren que la SOD1 mutada causa una alta represión transcripcional. Entre estos genes deprimidos se encuentra un grupo de elementos de respuesta antioxidante (ARE) que codifican para enzimas de la fase II detoxificante y proteínas de la respuesta antioxidante. Este grupo está regulado por el factor de transcripción Nrf2, por lo que aportan evidencias de que la desregulación de Nrf2 y de ARE, junto a la menor actividad de la vía de las pentosas fosfato y la menor generación de NADPH, representan significativamente la función tóxica que adquiere la proteína mutada SOD1 sobre la homeostasia redox. Además, estudios en médula espinal y corteza motora de casos esporádicos de ELA también describieron una reducción de la transcripción y expresión de Nrf2 (Sarlette et al., 2008).

En este sentido, también se han encontrado alteraciones en otros sistemas antioxidantes derivados de la mutación SOD1^{G93A} como por ejemplo en las isoformas α , μ y π de la glutathione transferasa (Allen et al., 2003, Kazmierczak et al., 2011). Teniendo en cuenta esta información, el aumento del estrés oxidativo no solo estaría relacionado con un aumento en la producción de ROS, sino que también con la pérdida de la capacidad de defensa antioxidante por parte de la célula. Esto se vería agravado en aquellas células que no tienen una capacidad de defensa

antioxidante desarrollada por no tener un excesivo metabolismo oxidativo, como puede ser el caso de las células cromafines humanas (Millaruelo et al., 1986), en dónde por ejemplo la glutathione transferasa π , tiene un grado de expresión moderada, y carece de otras isoformas como la α (Sundberg et al., 1993, Philbert et al., 1995).

iv) Otras enzimas que generan ROS

Existen enzimas con alta actividad celular que generan ROS. Entre estas enzimas, generalmente de expresión inducible, se encuentran la NADPH oxidasa (NOX), la xantina-oxidasa, el citocromo P450, o la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). El aumento de su expresión debido a un estrés tisular, produce un alto consumo de oxígeno a costa de su actividad. En nuestro estudio en la célula cromafín, el bajo consumo de oxígeno no mitocondrial encontrado (**Figura 30 Ce**) no puede explicar el aumento de ROS que observamos (**Figura 29**) a través de la actividad de estas enzimas, sugiriendo que no son las principales responsables del alto estrés oxidativo que sucede en el ratón SOD1^{G93A}. De hecho, en algunos estudios se sugirió que la relación entre la generación de ROS y la expresión de NOX no guarda una relación proporcional (más de 20 veces en una subunidad del complejo proteico de NOX y un aumento en ROS de solo 1.5 veces) (Seredenina et al., 2016).

Por último, cabe comentar que los niveles patológicos de ROS como los observados en este estudio, produce daños en ácidos nucleicos, proteínas (carbonilación o nitración) y lípidos (peroxidación), ampliamente descritos en el ratón SOD1^{G93A} (Liu et al., 1999). Ciertos subproductos, como los derivados de la glicación de proteínas, pueden evolucionar a productos finales avanzados de glicación y amplificar el proceso de ROS (Jomova et al., 2010, Parakh et al., 2013), hechos que deben tenerse en cuenta en el contexto del daño producido por el estrés oxidativo.

6. Las alteraciones mitocondriales observadas están causadas por proteínas del complejo MICOS que participan en la homeostasia mitocondrial, como OPA1

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que se mueven y se someten a procesos de fisión y fusión para mantener su estructura y sus funciones. Este dinamismo también es un mecanismo de protección ante situaciones de daño mitocondrial, pues mediante la fisión se facilita a la degradación de la mitocondria dañada por mitofagia y la fusión permite la dilución

y el control del daño (Lee and Yoon, 2018). Se sabe que un desequilibrio en esta dinámica está involucrado en varios procesos patológicos (Chan, 2006b, Liesa et al., 2009), como la senescencia celular (Park et al., 2010), la isquemia-reperfusión (Ong et al., 2010), la atrofia muscular (Romanello et al., 2010), y procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Wang et al., 2009), la enfermedad de Huntington (Carmo et al., 2018) o el parkinson (Van Laar and Berman, 2009). La perturbación de la fusión mitocondrial da como resultado defectos en la respiración y el potencial de membrana mitocondrial, un crecimiento celular deficiente y una mayor susceptibilidad a la muerte celular. Dos neuropatías hereditarias como la Charcot-Marie-Tooth tipo 2A y la atrofia óptica autosómica dominante, son causadas por mutaciones en las proteínas claves de fusión mitocondrial Mfn 2 y OPA1, lo que sugiere que la regulación adecuada de la dinámica mitocondrial es particularmente vital para las neuronas (Chen and Chan, 2005). Además, la fisión mitocondrial sucede durante la muerte celular y parece ser importante para la progresión de la vía apoptótica (Karbowski and Youle, 2003).

En nuestro estudio hemos encontrado que en las células cromafines del ratón mutado SOD1^{G93A} se producen alteraciones en la ultraestructura mitocondrial con hinchamiento de las crestas, del espacio intermembrana y de la matriz (**Figura 22**). Además, hemos observado que el ratón mutado SOD1^{G93A} cada vez tiene más mitocondrias pero son de menor tamaño (**Figura 23**). Sus crestas son más grandes (**Figura 24 C,D**) debido al hinchamiento (**Figura 24 Ab,d**), y van disminuyendo en número (**Figura 24 B**), con una mayor apertura de las uniones de cresta con la progresión de la enfermedad (**Figura 25 A,B**). Por el contrario, el ratón control cada vez tiene menos mitocondrias pero éstas se van haciendo de mayor tamaño (**Figura 23 E,F**), existiendo un incremento proporcional entre su tamaño y el de sus crestas (**Figura 24 D**). Estos cambios sugieren deficiencias en los procesos de fusión mitocondrial en el ratón mutado SOD1^{G93A}. A pesar de que es difícil evaluar la dinámica mitocondrial a través del análisis de imágenes de microscopía electrónica, el agrupamiento y fragmentación mitocondrial descrita en otros trabajos (Hirano et al., 1984, Sasaki and Iwata, 1996, Menzies et al., 2002a, Sotelo-Silveira et al., 2009), junto a la alteración en su transporte (Magrane and Manfredi, 2009, De Vos et al., 2007), son también indicativos de la alteración en la dinámica mitocondrial en este modelo de ELA.

Algunos trabajos de investigación más recientes se centran en el análisis de las proteínas que controlan este proceso. En este sentido, se ha demostrado un incremento en la expresión

de las proteínas de fisión y una disminución de las proteínas de fusión mitocondrial, tanto en líneas celulares como en médula espinal de ratones modelo de ELA (Ferri et al., 2010, Liu et al., 2013, Wang et al., 2018). Nosotros solo hemos estudiado una de estas proteínas (OPA1), pues además de regular la fusión mitocondrial está involucrada en la dinámica de las crestas mitocondriales (Quintana-Cabrera et al., 2018), dos procesos que hemos visto alterados de manera simultánea en este estudio.

OPA1 se localiza en la membrana mitocondrial interna. Las mitocondrias humanas contienen al menos ocho isoformas de OPA1 que surgen de un *splicing* alternativo. La escisión proteolítica de las formas largas (L-OPA1), a través de las proteasas Yme1L y OMA1, producirán las diferentes formas cortas (S-OPA1). El correcto equilibrio entre ambas controla, recíprocamente, la morfología mitocondrial (Del Dotto et al., 2018).

Uno de los hallazgos más relevantes de este estudio es que existe una menor expresión de la proteína OPA1 total en el ratón SOD1^{G93A} desde edades pre-sintomáticas, en relación al ratón control (**Figura 33 A,B**), lo que concuerda con lo que hemos observado en relación a la ultraestructura mitocondrial. Por otra parte, hemos observado que con la edad, S-OPA1 se incrementa en detrimento de L-OPA1 de manera proporcional en ambos ratones (**Figura 33 C,D**). Esto puede explicarse fisiológicamente por la regulación recíproca mediante las proteasas Yme1L y OMA1 en función del grado de estrés oxidativo y de las concentraciones de ATP celular que acontecen con la edad (Rainbolt et al., 2016). Además, hay que destacar que el mayor grado de despolarización mitocondrial que hemos observado en el ratón mutado SOD1^{G93A} (**Figura 27**), acompañado de las deficiencias en OXPHOS (**Figura 30**), debieran conducir hacia una estabilización de Yme1L e impedir la fusión mitocondrial a través del procesamiento de OPA1 (Mishra et al., 2014). Sin embargo, el hecho de que se produzca una disminución en la expresión de OPA1 total sin producirse cambios en el cociente S-OPA1/L-OPA1 entre el ratón mutado SOD1^{G93A} y el control, sugiere que los cambios en OPA1 total se producen a nivel de la regulación de la expresión génica, y no únicamente a nivel post-transcripcional. En este sentido, es interesante destacar que la disminución de la expresión de OPA1 está condicionada por el incremento en la producción de ROS en varios modelos animales (Yarosh et al., 2008, Bhandari et al., 2015). Este vínculo se debe a que los ROS pueden regular la expresión de OPA1 a través de determinados factores de transcripción, como por ejemplo, el factor kappa de cadena ligera de sobreexpresión de células B (NF-κB) (Haddad, 2002, Muller-Rischart et al., 2013, Laforge et al., 2016). Esta relación podría explicar nuestras

observaciones, aunque es necesario realizar más estudios que expliquen los mecanismos de regulación de expresión génica y procesamiento proteolítico de OPA1, ya que todavía no se conocen en profundidad.

Por último, cabe mencionar que NF- κ B además de regular OPA1 e inducir la fragmentación mitocondrial, puede activar la vía de PINK1/ubiquitinación dependiente de parkina situada en la membrana externa mitocondrial, produciendo la eliminación de estas mitocondrias por mitofagia (Muller-Rischart et al., 2013, Laforge et al., 2016). Nosotros hemos observado la presencia de mitofagosomas en las células cromafines del ratón SOD1^{G93A} (ver **Figura 22 Bh**), lo que refuerza la hipótesis de que NF- κ B pueda estar participando en este proceso. Otros factores que habría que tener en cuenta serían los mencionados anteriormente, como por ejemplo que la disrupción de la maquinaria de MICOS puede producir una regulación en la expresión de OPA1 (Darshi et al., 2011). Por lo tanto, parece claro que pueden coexistir múltiples mecanismos en la regulación de OPA1.

7. La acumulación y agregación de SOD1^{G93A} en las mitocondrias altera las proteínas implicadas en la homeostasia mitocondrial

La acumulación de la proteína mal plegada SOD1^{G93A} en las mitocondrias se ha propuesto como una posible explicación para la degeneración de la neurona motora en la ELA (Bruijn et al., 2004), en donde la médula espinal y las neuronas motoras están expuestas a su acumulación, y muestran una particular sensibilidad para la disfunción mitocondrial (Higgins et al., 2002, Jaarsma et al., 2000, Mattiazzi et al., 2002, Sasaki et al., 2004, Ahtoniemi et al., 2008). Nosotros hemos comprobado que en las células cromafines del ratón transgénico SOD1^{G93A} se produce un aumento de su expresión proteica paralela al curso clínico de la enfermedad, medida por *western blot* (**Figura 19 D,E**) e inmunofluorescencia (**Figura 19 C**). Más específicamente, mediante técnicas de colocalización con microscopía confocal (**Figura 19 y Figura 31**) y microscopía electrónica de transmisión marcando la proteína hSOD1^{G93A} con inmuno-oro (**Figura 32**), hemos comprobado que existe un paralelismo entre la acumulación de agregados a nivel celular y mitocondrial con la edad. También observamos que la sub-localización mitocondrial sucede tanto en el espacio intermembrana, como en las crestas mitocondriales como en la matriz (**Figura 32 A**). Estos resultados no han sido descritos previamente en profundidad, en donde la enzima estaba principalmente circunscrita al espacio

intermembrana, pegada hacia la membrana mitocondrial externa e interaccionando con el canal de aniones voltaje-dependiente (VDAC) (Israelson et al., 2010) o con Bcl-2 (Pasinelli et al., 2004). En adición a esto, hemos observado que se encuentra también localizada en todas las estructuras mitocondriales, y que su acumulación guarda una estrecha relación con las alteraciones descritas en la funcionalidad mitocondrial. Además, hemos visto que la proteína se puede acumular también en lugares extra-mitocondriales como el retículo endoplásmico (ver **Figura 32 E**), en el núcleo celular, en el citoplasma, en lisosomas, peroxisomas y en pequeños gránulos o cisternas. Aunque su presencia en estas localizaciones era conocida (Kira et al., 2002), en el caso concreto del retículo endoplásmico se ha descrito una acumulación anómala de agregados de proteínas SOD1^{G93A} mal plegadas en neuronas motoras del ratón transgénico, lo que causa una interacción con chaperonas que median la activación de rutas de estrés reticular y muerte neuronal por activación de caspasas (Kikuchi et al., 2006).

En las células eucariotas, la localización mitocondrial de la enzima SOD1 está regulada por su plegamiento. Una vez que se sintetiza en el citoplasma por los ribosomas, la enzima SOD1 es introducida en su forma no-plegada a través del transportador de la membrana mitocondrial externa (TOM) (Kawamata and Manfredi, 2008), o a través de MICOS hacia el espacio intermembrana mitocondrial (Varabyova et al., 2013). Su distribución mitocondrial y maduración proteica está controlada por la chaperona de cobre para SOD1 (CCS). La chaperona se encarga de complejarla con Zn²⁺ y de plegarla conformacionalmente a través de puentes disulfuro (Vehvilainen et al., 2014). Una vez formados, los monómeros de SOD1 plegada dimerizan para formar la enzima activa. La presencia de proteínas SOD1^{G93A} mal plegadas puede producir oligomerización entre proteínas SOD1 nativas o aberrantes, provocando así su agregación. Lo importante de este proceso es que se quedan atrapadas en el espacio intermembrana por no poder transportarse en su forma madura. Sin embargo, un resultado importante de nuestro estudio es que hemos observado que la SOD1^{G93A} puede localizarse también en la matriz y en las crestas mitocondriales, lo que implica que tiene que estar en una conformación inmadura que permita su transporte a estos lugares. Nosotros solo conocemos un trabajo en donde describieron, en motoneuronas de ratones SOD1^{G93A} y SOD1^{G85R}, la presencia de agregados inmaduros en la matriz mitocondrial (Vijayvergiya et al., 2005). Además, el hecho de que la acumulación de la proteína SOD1^{G93A} se incremente con el tiempo, y que esté correlacionado con el grado de apertura de las uniones de cresta, nos sugiere este mecanismo de paso hacia las crestas, un hecho que nunca fue descrito hasta la fecha.

Es importante resaltar que se pueden producir otros mecanismos de regulación de OPA1, además de los comentados anteriormente a través de NF- κ B. Uno de ellos que es importante discutir en el contexto de nuestro trabajo, debido a la acumulación SOD1^{G93A} descrita, es el de las proteínas de choque térmico (HSPs) por ser chaperonas que reconocen proteínas mal plegadas, ayudando a mantenerlas en su conformación adecuada o enviándolas a su degradación por la vía de la ubiquitinación-proteasoma (Hartl et al., 2011). De hecho, las chaperonas de 40 y 70 kDa HSP (Hsp40 y Hsp70) reconocen a la proteína mutada SOD1^{G93A} (Shinder et al., 2001), y su sobreexpresión previene la muerte de las neuronas motoras (Bruening et al., 1999, Takeuchi et al., 2002). La excesiva acumulación de SOD1^{G93A} puede secuestrar a Hsp70, impidiendo su degradación por la vía de la ubiquitinación-proteasoma (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2002, Weisberg et al., 2012). Curiosamente, Hsp40 y Hsp70 también tienen funciones importantes modulando la morfología mitocondrial. Estas acciones las ejercen a través del procesamiento de la proteína OPA1 (Lee et al., 2015). Aunque nosotros no hemos comprobado el grado de expresión de Hsp40 y Hsp70, el descenso de la expresión de OPA1 total (**Figura 33**), junto con la inhibición de la vía de ubiquitinación-proteasoma medida con el anticuerpo FK2, que reconoce las proteínas mono y poliubiquitinadas (**Figura 34**), permite especular con la posibilidad de que SOD1^{G93A} pueda estar interaccionando al menos con la chaperona Hsp70 mitocondrial, y que sea ésta, además de las ya comentadas, otra de las posibles causas implicadas en las alteraciones en la morfología mitocondrial a través de OPA1. Por lo tanto, pueden coexistir múltiples mecanismos que tengan como nexo en común la afectación de OPA1, o que alteren aquellas proteínas que participan en la homeostasia mitocondrial. Es preciso avanzar en el conocimiento del grado de implicación de estas proteínas para poder descifrar las causas que acontecen en las alteraciones mitocondriales en el ELA. Recientemente, Wang y colaboradores, estudiando osteocitos procedentes del ratón SOD1^{G93A}, y también sobreexpresando la enzima mutada en líneas celulares de osteocitos (Wang et al., 2018), sugirieron que la enzima mutada podía estar alterando la morfología mitocondrial a través de Drp1 y OPA1. En concordancia con Wang, la importancia de nuestro estudio está en que es el primero que propone este mecanismo en una célula nerviosa no motora, y lo discutimos en el contexto de la morfología, metabolismo y función mitocondrial. El estudio de los efectos de enzima mutada SOD1^{G93A} en células de distinta naturaleza metabólica (como por ejemplo, glía, osteocitos, hepatocitos o en nuestro

caso la célula cromafín), ayuda a comprender la importancia del fenotipo metabólico en la supervivencia celular y de los daños que acontecen en el síndrome del ELA.

8. Alteración metabólica y disfunción mitocondrial en ELA

En el presente trabajo demostramos por primera vez que en la célula cromafín del ratón SOD1^{G93A} se produce una alteración en la estructura mitocondrial desde etapas presintomáticas, con una repercusión funcional que afecta principalmente a su potencial de membrana y a su capacidad de responder a un estímulo de alta demanda energética, junto a una alteración metabólica y depresión del consumo de oxígeno no mitocondrial.

La alteración metabólica en los pacientes de ELA ha sido objeto de estudio, debido a sus implicaciones clínicas, pero existe cierta controversia. La homeostasia energética viene determinada por el balance de aporte y gasto energético, controlando los depósitos de energía en forma de grasa para mantener un índice de masa corporal estable. En los pacientes de ELA el balance se pierde debido a un mayor gasto energético y una menor ingesta, por lo que presentan un menor índice de masa corporal que empeora con la progresión de la enfermedad. El menor aporte energético relacionado con las alteraciones de disfagia no bastaría para explicar este fenómeno, pues también se ve potenciado por el estado hipermetabólico descrito en los pacientes. Este hipermetabolismo llama la atención y contrasta con lo esperado de una denervación del músculo esquelético como sucede en el ELA, lo que debería desembocar en un hipometabolismo, al perder esta fuente de consumo de energía (Dupuis et al., 2011). Las causas de estas alteraciones todavía se desconocen, pero el papel de la señal de insulina y la actividad mitocondrial se desmarcan como principales protagonistas.

Para estudiar la alteración metabólica en la ELA, se han realizado estudios de consumo de glucosa en cerebro, mediante tomografía de emisión de positrones (PET) realizados en pacientes. Se ha observado tanto hipometabolismo (Hatazawa et al., 1988, Van Laere et al., 2014) como hipermetabolismo (Pagani et al., 2014), aunque en este estudio, el hipermetabolismo se relaciona con la posible gliosis. Por otro lado, también se han realizado estudios basados en la ecuación de Harris y Benedict para calcular el ratio metabólico de los pacientes, que demuestra la existencia de un estado hipermetabólico (Desport et al., 2001, Desport et al., 2005, Funalot et al., 2009), así como estudios que demuestran un mayor gasto de energía en reposo (Bouteloup et al., 2009).

La limitación de realizar estudios en pacientes a edades presintomáticas y la heterogeneidad de resultados en función de la zona cerebral o del tipo de ELA, ha impulsado el uso de los modelos animales y celulares para los estudios metabólicos en los distintos tipos de ELA familiar. En este sentido, la investigación básica se ha centrado en el estudio del consumo de glucosa, en la actividad mitocondrial y de sus complejos de la cadena de transporte electrónico, en el análisis de los depósitos de ATP y en el estudio bioquímico de las principales vías metabólicas.

En el ratón SOD1^{G93A}, se caracterizó el hipermetabolismo y el menor pesocorporal y masa de grasa, incluso semanas antes del inicio de los síntomas (Dupuis et al., 2004), definiendo el hipermetabolismo y el déficit energético intrínseco a la patología ELA. El grupo de M. Flint Beal, a través de numerosos trabajos estableció la relación entre la mayor actividad de los complejos mitocondriales (el CI, CII y CIV) en cerebros de pacientes *post mortem* y también en el ratón SOD1^{G93A} (Bowling et al., 1993, Browne et al., 1998, Browne et al., 2006); estos datos contrastan con la menor actividad de la cadena de transporte electrónico descrita por otros grupos en la médula espinal de estos ratones, incluso desde edades presintomáticas (Jung et al., 2002). Aunque este estudio limita el defecto a la zona ventral de la médula espinal, el déficit en la actividad de los complejos mitocondriales en ELA cada vez parece más definido. El grupo de Pamela J Shawn, de la universidad de Sheffield, que ha ayudado al avance del estudio de la disfunción mitocondrial y la alteración metabólica en el ELA con interesantes trabajos mediante la transfección estable y en nieles fisiológicos de la mutación SOD1^{G93A}, ha descrito una menor actividad de los complejos II y IV en líneas celulares NSC34 (Menzies et al., 2002a, Richardson et al., 2013), y también en estudios en fibroblastos derivados de pacientes de ELA (Allen et al., 2014, Allen et al., 2015). Además, en el ratón transgénico SOD1^{G93A} también se detectó una menor actividad mitocondrial a través del complejo IV en el cerebro y la médula espinal, incluso en etapas presintomáticas (Kirkinezos et al., 2005). En cuanto al potencial de membrana, se observó que estaba disminuido tanto en la línea SH-SY5Y (Carri et al., 1997), como en la NSC34 (Richardson et al., 2013) y en fibroblastos derivados de pacientes con ELA (Walczak et al., 2019). También parece haber un consenso en la disminución de la capacidad respiratoria de reserva en los resultados obtenidos en distintos modelos (Allen et al., 2014, Pehar et al., 2014).

A la vista de estos datos y los mostrados en nuestro estudio, no cabe duda de la existencia de una alteración del metabolismo energético en la ELA. Además, los tratamientos para

mejorar la función energética mitocondrial como la administración de creatina (Browne et al., 2006, Dupuis et al., 2004), o piruvato (Park et al., 2007), han mostrado resultados prometedores.

Por lo tanto, la neurodegeneración tanto en ELA como en otras enfermedades neurodegenerativas empiezan a tener una fuerte asociación con un metabolismo energético ineficiente. Se sabe que la incidencia de diabetes es mayor en la enfermedad de Húntington y en la de Alzheimer; la dieta altamente calórica empeora el alzheimer mientras que con la restricción calórica se comprobó una mejor evolución; y muchos genes relacionados con la fisiología mitocondrial están implicados en la enfermedad de Parkinson (Dupuis et al., 2011). Por lo tanto, son necesarios nuevos esfuerzos y más estudios en los distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas, que ayuden a descifrar la implicación de metabolismo energético en el desarrollo y progresión de estas enfermedades.

La manipulación del metabolismo energético es una estrategia cada vez más consolidada, incluso en enfermedades como el cáncer, la inmunodeficiencia o el infarto de miocardio. Pero necesitamos ampliar el conocimiento sobre el metabolismo en la motoneurona, ya no solo por saber cómo interacciona la motoneurona metabólicamente con otras células; como por ejemplo con la glía, sino incluso a nivel intracelular. Este nivel de especificidad metabólica para la comprensión de la enfermedad se debe a que los distintos procesos celulares pueden estar compartimentalizados, requiriendo distintos sustratos del metabolismo energético. Por ejemplo, la exocitosis puede demandar más de las rutas glicolíticas, la síntesis de neurotransmisores de la ruta de las pentosas fosfato, y la síntesis proteica del metabolismo oxidativo. Aunque es temprano para considerar la ELA como una enfermedad metabólica, las evidencias que se han mostrado en los últimos años la unen cada vez más. El conocimiento de metabolismo en ELA puede ayudar también a identificar nuevas dianas estratégicas terapéuticas o nuevas formas de suplementar nutricionalmente a los pacientes.

A modo de resumen, en el presente trabajo nos hemos propuesto realizar un estudio de las principales alteraciones mitocondriales observadas en la célula cromafín de los ratones transgénicos SOD1^{G93A} analizados en distintas etapas de la enfermedad (a 30 días de edad o asintomáticos, y a 120 días o sintomáticos), centrándonos en su ultraestructura, metabolismo y funcionalidad mitocondrial, para que nos ayude a comprender mejor los mecanismos que participan en las etiopatogenia y en la progresión de la ELA.

Hemos demostrado que la proteína mutada SOD1^{G93A} se distribuye en el interior mitocondrial en el espacio intermembrana, crestas y matriz, en donde provoca: i) la pérdida de la fusión y de la maduración mitocondrial con la edad; ii) cambios ultraestructurales como hinchamiento, vacuolización, pérdida de crestas y apertura de las uniones de cresta; iii) pérdida del Ψ_m , con la consiguiente despolarización mitocondrial; iv) generación de ROS incrementada; v) alteraciones metabólicas en el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS); y vi) disminución de la vía ubiquitinación-proteasoma. Estos eventos suceden a edades tempranas, y están directamente relacionados con el grado de expresión intramitocondrial de la enzima mutada SOD1^{G93A}, agravándose con el transcurso de la enfermedad. Nuestra principal observación es que la SOD1^{G93A} genera estas alteraciones mitocondriales a través de la regulación de la expresión génica de OPA1, que está disminuída. Además, aunque pueden estar implicadas múltiples vías en su regulación, nuestros resultados permiten especular con la posibilidad de que puedan participar en este proceso las chaperonas del tipo Hsp70 o el factor de transcripción NF- κ B. Estos mecanismos concretos deberían estudiarse en detalle en posteriores trabajos.

En los últimos años, el interés por la alteración mitocondrial ha llevado a la publicación de artículos en los que se muestran algunos de los daños que nosotros caracterizamos en nuestro estudio, pero la diferencia es que cada trabajo se ha centrado específicamente en una alteración mitocondrial, y han utilizado modelos muy distintos como fibroblastos derivados de pacientes, motoneuronas, músculo, osteocitos o células transfectadas con la enzima mutada. Por lo tanto, en este trabajo hemos visto por primera vez en conjunto todas las alteraciones mitocondriales, que suceden al mismo tiempo en un solo tipo celular del ratón SOD1^{G93A}, y que además, vemos su evolución con el desarrollo de la enfermedad. En este sentido podríamos decir que el déficit de fusión mitocondrial es constante en el modelo, mientras que la alteración de crestas y uniones de creta sí que muestran una peor evolución a medida que avanza la enfermedad.

El hecho de que la proteína SOD1^{G93A} se acumule e induzca un daño mitocondrial en las células cromafines implica un deterioro de las funciones del eje simpato-adrenal. La relevancia clínica de nuestro estudio es que los pacientes pueden estar peor adaptados a una situación de estrés fisiológico (por ejemplo, ante un ejercicio intenso), o patológico (por ejemplo, la secreción de catecolaminas ante una situación isquémica); de hecho, los pacientes de ELA fallecen de muerte súbita por no ser capaces de compensar la parada cardiorrespiratoria que sufren. En este sentido, nuestros resultados sugieren que el déficit bioenergético de la célula cromafín así como su baja capacidad de reserva respiratoria, puede hacer que colapse en momentos de estrés. Nuestros resultados pueden ayudar a proponer nuevas dianas terapéuticas, como por ejemplo OPA1 o Hsp70, sobre las que actuar farmacoterapéuticamente en pacientes de ELA.

La rápida degeneración que sufren las motoneuronas ha focalizado durante muchos años la investigación en este sistema, enmascarando los daños que se producen en los demás. La acortada supervivencia del paciente desde que se manifiestan los síntomas evita que el desarrollo de otras alteraciones de evolución más lenta consiga ser clínicamente relevante, pero cada vez queda más patente su importancia en el desarrollo de la enfermedad. El modelo SOD1^{G93A} está siendo trascendental en el estudio de la muerte selectiva de la motoneurona y sobre la participación de otros tipos celulares en la enfermedad. Utilizando ratones que expresaban la enzima mutada específicamente en motoneuronas y oligodendrocitos, se comprobó que no era suficiente para producir la enfermedad, señalando que las células no neuronales (que no expresan la enzima mutada) retrasan el daño en la motoneurona (con la enzima mutada), y a su vez pone de manifiesto la importancia de su expresión en otros tipos celulares para el desarrollo de la ELA (Clement et al., 2003, Yamanaka et al., 2008). Otros estudios sin embargo demostraron que, delimitando la expresión de la enzima mutada al músculo esquelético, sí consigue producir degeneración de las motoneuronas, junto a la patología motora (Wong and Martin, 2010). Estos resultados también ponen de manifiesto la importancia de la expresión de la enzima mutada en células no motoneuronales, en el origen y el desarrollo de la ELA, y refuerzan la importancia de realizar estudios como el nuestro, en el sistema simpato-adrenal.

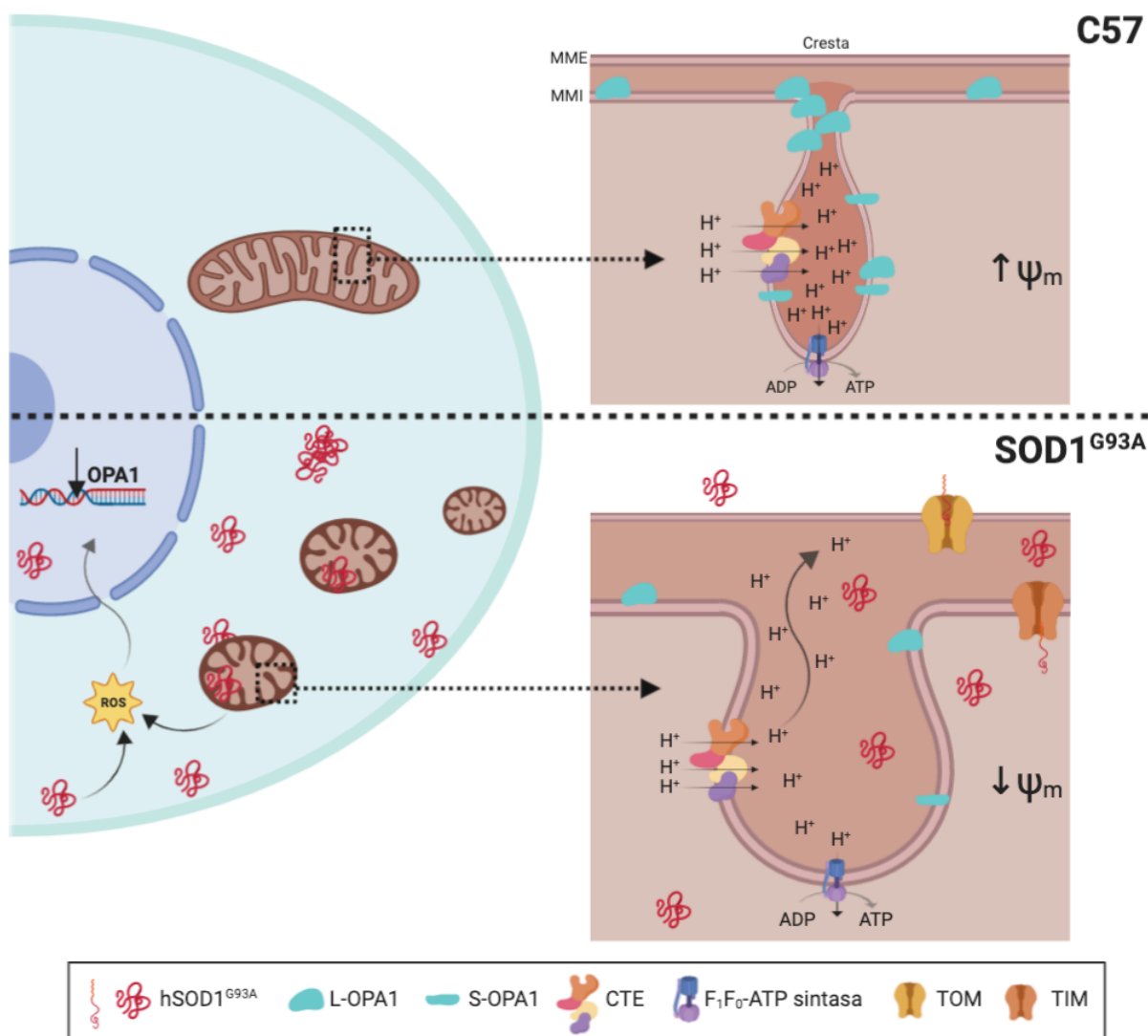


Figura 35. Esquema gráfico que resume los principales hallazgos realizados sobre la estructura y la función mitocondrial en la célula cromafín del ratón SOD1^{G93A}. En la parte superior se representa una mitocondria en citoplasma de una célula cromafín de ratón control C57, y a su derecha la ampliación de una cresta mitocondrial. En ella se puede observar la localización de la proteína OPA1 (tanto las isoformas S como L, en azul), los complejos de la cadena de transporte electrónico (CTE), y la F₁F₀-ATP sintasa. La correcta gestión del tamaño de la unión de cresta permite el correcto gradiente de protones y el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial. En la parte inferior, se representa lo que sucede en la célula cromafín del ratón SOD1^{G93A}: i) mayor número de mitocondrias y de menor tamaño; ii) acumulación de la proteína mutada hSOD1^{G93A} en el citoplasma, a todos los niveles de la mitocondria y en el núcleo; iii) formación de agregados de proteína hSOD1^{G93A}; iv) aumento de la producción de radicales libres; v) disminución de la expresión génica de OPA1; vi) aumento del tamaño de las uniones de cresta; vii) difusión de elementos de la cresta mitocondrial hacia el espacio intermembrana; y viii) pérdida del potencial de membrana mitocondrial junto a deficiencia en OXPHOS.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados presentados y discutidos la presente Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes **conclusiones**:

1. En la CC del ratón SOD1^{G93A} se producen alteraciones morfológicas mitocondriales desde etapas presintomáticas, de forma similar a lo que ocurre en la motoneurona, y que se agravan con la instauración de la enfermedad. Este daño mitocondrial se caracteriza por un hinchamiento de las crestas, condicionado por un mayor tamaño de uniones de cresta, así como la dificultad para fusionarse manteniendo una población de mayor número y menor tamaño de mitocondrias en etapas sintomáticas.
2. La alteración de las crestas mitocondriales, concretamente las uniones de cresta, se traduce en una pérdida de potencial de membrana mitocondrial.
3. El perfil bioenergético de la CC del ratón SOD1^{G93A} está modificado, debido al daño mitocondrial, presentando una menor respiración máxima y menor capacidad de reserva respiratoria mitocondrial, lo que confiere mayor susceptibilidad a los eventos de gran requerimiento energético. Además, el menor consumo de oxígeno no mitocondrial demuestra déficits de rutas metabólicas no mitocondriales.
4. La CC del ratón SOD1^{G93A} presenta niveles elevados de estrés oxidativo, generando mayor oxidación de moléculas que el ratón control de manera constante desde etapas presintomáticas y a lo largo del desarrollo de la enfermedad.
5. La proteína hSOD1^{G93A} se expresa en la CC del ratón mutado. Su expresión aumenta con el desarrollo de la enfermedad, acumulándose mayoritariamente en el citosol pero con inclusiones nucleares, mitocondriales y en el retículo endoplásmico.
6. La proteína hSOD1^{G93A} se localiza en el interior mitocondrial a nivel del espacio intermembrana, matriz y crestas, aumentando su colocalización a medida que se desarrolla la enfermedad.
7. La proteína clave en la dinámica mitocondrial y de sus crestas, la OPA1, se encuentra menos expresada en la CC del ratón SOD1^{G93A} que en el ratón control desde etapas presintomáticas hasta el desarrollo de la enfermedad.
8. La CC del ratón SOD1^{G93A} no realiza un reciclado correcto de proteínas una vez instaurada la enfermedad, existiendo un déficit de proteínas ubiquitinadas.

Como conclusión general del trabajo podemos decir que durante el desarrollo de la ELA por la mutación SOD1^{G93A}, en este modelo murino se produce una afectación no exclusiva de la motoneurona desde estadios presintomáticos, pues hemos visto que también sucede en la célula cromafín. Nuestros datos refuerzan la idea de la alteración mitocondrial como eje central de la fisiopatología y demuestran la importancia del tipo de metabolismo celular en la singularidad para el desarrollo de la enfermedad. Además, destacamos la afectación del eje simpático-adrenal en la ELA, tanto para el diagnóstico temprano como para el seguimiento y tratamiento de los pacientes. Por último, nuestros resultados señalan a la proteína OPA1 y los sistemas de regulación de la dinámica mitocondrial como principales dianas farmacológicas para evitar o enlentecer la progresión de la enfermedad.

CONCLUSIONS

Based on the results submitted in this Doctoral Thesis, the following **conclusions** can be drawn:

1. Mitochondrial morphological alterations occur In the CC of the mouse SOD1^{G93A} from presymptomatic stages, similar to those in the motor neuron. This mitochondrial damage is aggravated with the establishment of the disease and it is characterized by cristae swelling, conditioned by larger size of cristae junctions. Furthermore, there is a dysfunction in mitochondrial fusion that display a mitochondria population of greater number and smaller size at symptomatic stages.
2. The alteration of the mitochondrial cristae, specifically the cristae junctions, results in a loss of mitochondrial membrane potential.
3. Mitochondrial damage induces changes in the bioenergetics profile of the CC in the SOD1^{G93A} mouse. There is a lower mitochondrial maximal respiration and lower mitochondrial spare respiratory capacity, which confers greater susceptibility to events of high energy requirement. In addition, the lower consumption of non-mitochondrial oxygen demonstrates deficits of non-mitochondrial metabolic pathways.
4. The CC of the SOD1^{G93A} mouse presents high levels of oxidative stress, generating greater oxidation of molecules than in the control mouse. This oxidative stress is constantly even from presymptomatic stages and throughout the development of the disease.
5. The hSOD1^{G93A} protein is expressed in the CC of the mutated mouse. Its expression increases with the development of the disease, accumulating mostly in the cytosol but with nuclear, mitochondrial and endoplasmic reticulum inclusions.
6. The hSOD1^{G93A} protein is located in the mitochondria at the level of the intermembrane space, matrix and cristae, increasing its colocalization as the disease develops.
7. OPA1 expression, a key protein in mitochondrial dynamics and its crests, is decreased in the CC of the SOD1^{G93A} mouse respect to the control mouse. This lower expression occurs from presymptomatic stages to the development of the disease.
8. The CC of the SOD1^{G93A} mouse does not perform a correct recycling of proteins after the symptoms onset, showing a deficit of ubiquitinated proteins.

Finally, the general conclusion is the following:

During the ALS development by the SOD1^{G93A} mutation, in this murine model there is a non-exclusive motor neuron involvement from presymptomatic stages, since we have seen that it also happens in the chromaffin cell. Our data emphasizes the idea of mitochondrial alteration as the central axis of the ALS pathophysiology, and demonstrates the importance of the different types of cellular metabolisms in the singularity for the affecttion of the disease. In addition, we highlight the involvement of the sympathetic-adrenal axis in ALS, both for early diagnosis and for the follow-up and treatment of patients. Finally, our results point out to the OPA1 protein and the mitochondrial dynamics regulation systems as primary pharmacological targets to prevent or slow the progression of the disease.

REFERENCIAS

- AGIER, V., OLIVIERO, P., LAINE, J., L'HERMITTE-STEAD, C., GIRARD, S., FILLAUT, S., et al. 2012. Defective mitochondrial fusion, altered respiratory function, and distorted cristae structure in skin fibroblasts with heterozygous OPA1 mutations. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 1570-80.
- AHTONIEMI, T., JARONEN, M., KEKSA-GOLDSTEINE, V., GOLDSTEINS, G. & KOISTINAHO, J. 2008. Mutant SOD1 from spinal cord of G93A rats is destabilized and binds to inner mitochondrial membrane. *Neurobiol Dis*, 32, 479-85.
- ALLEN, S., HEATH, P. R., KIRBY, J., WHARTON, S. B., COOKSON, M. R., MENZIES, F. M., et al. 2003. Analysis of the cytosolic proteome in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis reveals alterations to the proteasome, antioxidant defenses, and nitric oxide synthetic pathways. *J Biol Chem*, 278, 6371-83.
- ALLEN, S. P., DUFFY, L. M., SHAW, P. J. & GRIERSON, A. J. 2015. Altered age-related changes in bioenergetic properties and mitochondrial morphology in fibroblasts from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Aging*, 36, 2893-903.
- ALLEN, S. P., RAJAN, S., DUFFY, L., MORTIBOYS, H., HIGGINBOTTOM, A., GRIERSON, A. J., et al. 2014. Superoxide dismutase 1 mutation in a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis shifts energy generation from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Neurobiol Aging*, 35, 1499-509.
- ALOE, L. & LEVI-MONTALCINI, R. 1979. Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons: effect of antiserum to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 1246-50.
- AMATI-BONNEAU, P., VALENTINO, M. L., REYNIER, P., GALLARDO, M. E., BORNSTEIN, B., BOISSIERE, A., et al. 2008. OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain*, 131, 338-51.
- AMUTHA, B., GORDON, D. M., GU, Y. & PAIN, D. 2004. A novel role of Mgm1p, a dynamin-related GTPase, in ATP synthase assembly and cristae formation/maintenance. *Biochem J*, 381, 19-23.
- ANDERSON, D. J. 1993. Molecular control of cell fate in the neural crest: the sympathoadrenal lineage. *Annu Rev Neurosci*, 16, 129-58.
- ARRIBAS-BLAZQUEZ, M., OLIVOS-ORE, L. A., BARAHONA, M. V., SANCHEZ DE LA MUELA, M., SOLAR, V., JIMENEZ, E., et al. 2019. Overexpression of P2X3 and P2X7 Receptors and TRPV1 Channels in Adrenomedullary Chromaffin Cells in a Rat Model of Neuropathic Pain. *Int J Mol Sci*, 20.
- ASAI, H., HIRANO, M., UDAKA, F., SHIMADA, K., ODA, M., KUBORI, T., et al. 2007. Sympathetic disturbances increase risk of sudden cardiac arrest in sporadic ALS. *J Neurol Sci*, 254, 78-83.
- AUNIS, D. & LANGLEY, K. 1999. Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand*, 167, 89-97.
- BALTADZHIEVA, R., GUREVICH, T. & KORCZYN, A. D. 2005. Autonomic impairment in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol*, 18, 487-93.
- BANCI, L., BERTINI, I., CRAMARO, F., DEL CONTE, R. & VIEZZOLI, M. S. 2002. The solution structure of reduced dimeric copper zinc superoxide dismutase. The structural effects of dimerization. *Eur J Biochem*, 269, 1905-15.
- BASSO, M., POZZI, S., TORTAROLO, M., FIORDALISO, F., BISIGHINI, C., PASETTO, L., et al. 2013. Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 288, 15699-711.
- BERTHOLET, A. M., MILLET, A. M., GUILLERMIN, O., DALOYAU, M., DAVEZAC, N., MIQUEL, M. C., et al. 2013. OPA1 loss of function affects in vitro neuronal maturation. *Brain*, 136, 1518-33.
- BHANDARI, P., SONG, M. & DORN, G. W., 2ND 2015. Dissociation of mitochondrial from sarcoplasmic reticular stress in Drosophila cardiomyopathy induced by molecularly distinct mitochondrial fusion defects. *J Mol Cell Cardiol*, 80, 71-80.
- BOHNERT, M., ZERBES, R. M., DAVIES, K. M., MUHLEIP, A. W., RAMPELT, H., HORVATH, S. E., et al. 2015. Central role of Mic10 in the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Cell Metab*, 21, 747-55.
- BOILLEE, S., VANDE VELDE, C. & CLEVELAND, D. W. 2006. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*, 52, 39-59.
- BOMFIM, G. H. S., MENDEZ-LOPEZ, I., FERNANDEZ-MORALES, J. C., PADIN, J. F., JURKIEWICZ, A., JURKIEWICZ, N. H., et al. 2017. Electrophysiological properties and augmented catecholamine release from chromaffin cells of WKY and SHR rats contributing to the hypertension development elicited by chronic EtOH consumption. *Eur J Pharmacol*, 803, 65-77.
- BORGES, R., GANDIA, L. & CARBONE, E. 2018. Old and emerging concepts on adrenal chromaffin cell stimulus-secretion coupling. *Pflugers Arch*, 470, 1-6.

- BORNSTEIN, S. R., EHRHART-BORNSTEIN, M., ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS, A., EISENHOFER, G., VUKICEVIC, V., LICINIO, J., et al. 2012. Chromaffin cells: the peripheral brain. *Mol Psychiatry*, 17, 354-8.
- BORNSTEIN, S. R., EHRHART-BORNSTEIN, M. & SCHERBAUM, W. A. 1997. Morphological and functional studies of the paracrine interaction between cortex and medulla in the adrenal gland. *Microsc Res Tech*, 36, 520-33.
- BORTHWICK, G. M., JOHNSON, M. A., INCE, P. G., SHAW, P. J. & TURNBULL, D. M. 1999. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Ann Neurol*, 46, 787-90.
- BOSCO, D. A., MORFINI, G., KARABACAK, N. M., SONG, Y., GROS-LOUIS, F., PASINELLI, P., et al. 2010. Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and a common pathogenic pathway in ALS. *Nat Neurosci*, 13, 1396-403.
- BOUTELOUP, C., DESPORT, J. C., CLAVELOU, P., GUY, N., DERUMEAUX-BUREL, H., FERRIER, A., et al. 2009. Hypermetabolism in ALS patients: an early and persistent phenomenon. *J Neurol*, 256, 1236-42.
- BOWLING, A. C., SCHULZ, J. B., BROWN, R. H., JR. & BEAL, M. F. 1993. Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 61, 2322-5.
- BRAND, M. D. 2000. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol*, 35, 811-20.
- BRITES, D. & VAZ, A. R. 2014. Microglia centered pathogenesis in ALS: insights in cell interconnectivity. *Front Cell Neurosci*, 8, 117.
- BROOKS, B. R. 1994. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci*, 124 Suppl, 96-107.
- BROWNE, S. E., BOWLING, A. C., BAIK, M. J., GURNEY, M., BROWN, R. H., JR. & BEAL, M. F. 1998. Metabolic dysfunction in familial, but not sporadic, amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 71, 281-7.
- BROWNE, S. E., YANG, L., DIMAURO, J. P., FULLER, S. W., LICATA, S. C. & BEAL, M. F. 2006. Bioenergetic abnormalities in discrete cerebral motor pathways presage spinal cord pathology in the G93A SOD1 mouse model of ALS. *Neurobiol Dis*, 22, 599-610.
- BRUENING, W., ROY, J., GIASSON, B., FIGLEWICZ, D. A., MUSHYNSKI, W. E. & DURHAM, H. D. 1999. Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 72, 693-9.
- BRUIJN, L. I., MILLER, T. M. & CLEVELAND, D. W. 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci*, 27, 723-49.
- BURGOYNE, R. D. 1991. Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta*, 1071, 174-202.
- BURGOYNE, R. D. 1995. Mechanisms of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells. *J Physiol Pharmacol*, 46, 273-83.
- CALORIO, C., GAVELLO, D., GUARINA, L., SALIO, C., SASSOE-POGNETTO, M., RIGANTI, C., et al. 2019. Impaired chromaffin cell excitability and exocytosis in autistic Timothy syndrome TS2-neo mouse rescued by L-type calcium channel blockers. *J Physiol*, 597, 1705-1733.
- CALVO-GALLARDO, E., DE PASCUAL, R., FERNANDEZ-MORALES, J. C., ARRANZ-TAGARRO, J. A., MAROTO, M., NANCLARES, C., et al. 2015. Depressed excitability and ion currents linked to slow exocytotic fusion pore in chromaffin cells of the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 308, C1-19.
- CARMO, C., NAIA, L., LOPES, C. & REGO, A. C. 2018. Mitochondrial Dysfunction in Huntington's Disease. *Adv Exp Med Biol*, 1049, 59-83.
- CARRI, M. T., FERRI, A., BATTISTONI, A., FAMHY, L., GABBIANELLI, R., POCCIA, F., et al. 1997. Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Lett*, 414, 365-8.
- CASSINA, P., CASSINA, A., PEHAR, M., CASTELLANOS, R., GANDELMAN, M., DE LEON, A., et al. 2008. Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J Neurosci*, 28, 4115-22.
- CELOTTO, A. M., FRANK, A. C., MCGRATH, S. W., FERGESTAD, T., VAN VOORHIES, W. A., BUTTLE, K. F., et al. 2006. Mitochondrial encephalomyopathy in Drosophila. *J Neurosci*, 26, 810-20.

- CHAN, D. C. 2006a. Dissecting mitochondrial fusion. *Dev Cell*, 11, 592-4.
- CHAN, D. C. 2006b. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, 125, 1241-52.
- CHEN, B. K., STAFF, N. P., KNIGHT, A. M., NESBITT, J. J., BUTLER, G. W., PADLEY, D. J., et al. 2015. A safety study on intrathecal delivery of autologous mesenchymal stromal cells in rabbits directly supporting Phase I human trials. *Transfusion*, 55, 1013-20.
- CHEN, H. & CHAN, D. C. 2005. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet*, 14 Spec No. 2, R283-9.
- CHEN, X., SHANG, H., QIU, X., FUJIWARA, N., CUI, L., LI, X. M., et al. 2012. Oxidative modification of cysteine 111 promotes disulfide bond-independent aggregation of SOD1. *Neurochem Res*, 37, 835-45.
- CHEVROLLIER, A., GUILLET, V., LOISEAU, D., GUEGUEN, N., DE CRESCENZO, M. A., VERNY, C., et al. 2008. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol*, 63, 794-8.
- CHIA, R., CHIO, A. & TRAYNOR, B. J. 2018. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol*, 17, 94-102.
- CHIA, R., TATTUM, M. H., JONES, S., COLLINGE, J., FISHER, E. M. & JACKSON, G. S. 2010. Superoxide dismutase 1 and tgSOD1 mouse spinal cord seed fibrils, suggesting a propagative cell death mechanism in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 5, e10627.
- CHU, C. T., JI, J., DAGDA, R. K., JIANG, J. F., TYURINA, Y. Y., KAPRALOV, A. A., et al. 2013. Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol*, 15, 1197-1205.
- CLEMENT, A. M., NGUYEN, M. D., ROBERTS, E. A., GARCIA, M. L., BOILLEE, S., RULE, M., et al. 2003. Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science*, 302, 113-7.
- COGLIATI, S., ENRIQUEZ, J. A. & SCORRANO, L. 2016. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem Sci*, 41, 261-273.
- CORCIA, P., TAUBER, C., VERCOULLIE, J., ARLICOT, N., PRUNIER, C., PRALINE, J., et al. 2012. Molecular imaging of microglial activation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 7, e52941.
- COUPLAND, R. E. 1989. The natural history of the chromaffin cell--twenty-five years on the beginning. *Arch Histol Cytol*, 52 Suppl, 331-41.
- CRAPO, J. D., OURY, T., RABOUILLE, C., SLOT, J. W. & CHANG, L. Y. 1992. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10405-9.
- CROCKFORD, C., NEWTON, J., LONERGAN, K., CHIWER, T., BOOTH, T., CHANDRAN, S., et al. 2018. ALS-specific cognitive and behavior changes associated with advancing disease stage in ALS. *Neurology*, 91, e1370-e1380.
- DAEMS, W. T. & WISSE, E. 1966. Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. *J Ultrastruct Res*, 16, 123-40.
- DAL CANTO, M. C. & GURNEY, M. E. 1994. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol*, 145, 1271-9.
- DARSHI, M., MENDIOLA, V. L., MACKAY, M. R., MURPHY, A. N., KOLLER, A., PERKINS, G. A., et al. 2011. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem*, 286, 2918-32.
- DAVIES, K. M., ANSELM, C., WITTIG, I., FARALDO-GOMEZ, J. D. & KUHLBRANDT, W. 2012. Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 13602-7.
- DAYANITHI, G., CHEN-KUO-CHANG, M., VIERO, C., HAMEL, C., MULLER, A. & LENAERS, G. 2010. Characterization of Ca²⁺ signalling in postnatal mouse retinal ganglion cells: involvement of OPA1 in Ca²⁺ clearance. *Ophthalmic Genet*, 31, 53-65.
- DE CARVALHO, M., DENGLER, R., EISEN, A., ENGLAND, J. D., KAJI, R., KIMURA, J., et al. 2008. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol*, 119, 497-503.
- DE DIEGO, A. M., LORRIO, S., CALVO-GALLARDO, E. & GARCIA, A. G. 2012. Smaller quantal size and faster kinetics of single exocytotic events in chromaffin cells from the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 428, 482-6.
- DE DIEGO, A. M. G. & GARCIA, A. G. 2018. Altered exocytosis in chromaffin cells from mouse models of neurodegenerative diseases. *Acta Physiol (Oxf)*, 224, e13090.
- DE VOS, K. J., CHAPMAN, A. L., TENNANT, M. E., MANSER, C., TUDOR, E. L., LAU, K. F., et al. 2007. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet*, 16, 2720-2728.

- DEITCH, J. S., ALEXANDER, G. M., BENSINGER, A., YANG, S., JIANG, J. T. & HEIMAN-PATTERSON, T. D. 2014. Phenotype of transgenic mice carrying a very low copy number of the mutant human G93A superoxide dismutase-1 gene associated with amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 9, e99879.
- DEJESUS-HERNANDEZ, M., MACKENZIE, I. R., BOEVE, B. F., BOXER, A. L., BAKER, M., RUTHERFORD, N. J., et al. 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72, 245-56.
- DEL DOTTO, V., FOGAZZA, M., CARELLI, V., RUGOLO, M. & ZANNA, C. 2018. Eight human OPA1 isoforms, long and short: What are they for? *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1859, 263-269.
- DEL DOTTO, V., MISHRA, P., VIDONI, S., FOGAZZA, M., MARESCA, A., CAPOALI, L., et al. 2017. OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions. *Cell Rep*, 19, 2557-2571.
- DELETTRE, C., LENAERS, G., GRIFFOIN, J. M., GIGAREL, N., LORENZO, C., BELENGUER, P., et al. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet*, 26, 207-10.
- DENG, H. X., SHI, Y., FURUKAWA, Y., ZHAI, H., FU, R., LIU, E., et al. 2006. Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7142-7.
- DENG, J., YANG, M., CHEN, Y., CHEN, X., LIU, J., SUN, S., et al. 2015. FUS Interacts with HSP60 to Promote Mitochondrial Damage. *PLoS Genet*, 11, e1005357.
- DESPOINT, J. C., PREUX, P. M., MAGY, L., BOIRIE, Y., VALLAT, J. M., BEAUFREIRE, B., et al. 2001. Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Clin Nutr*, 74, 328-34.
- DESPOINT, J. C., TORNAY, F., LACOSTE, M., PREUX, P. M. & COURATIER, P. 2005. Hypermetabolism in ALS: correlations with clinical and paraclinical parameters. *Neurodegener Dis*, 2, 202-7.
- DHARA, M., MOHRMANN, R. & BRUNS, D. 2018. v-SNARE function in chromaffin cells. *Pflugers Arch*, 470, 169-180.
- DIAZ-FLORES, L., GUTIERREZ, R., VARELA, H., VALLADARES, F., ALVAREZ-ARGUELLES, H. & BORGES, R. 2008. Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)*, 192, 145-63.
- DODGE, J. C., TRELEAVEN, C. M., FIDLER, J. A., TAMSETT, T. J., BAO, C., SEARLES, M., et al. 2013. Metabolic signatures of amyotrophic lateral sclerosis reveal insights into disease pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 10812-7.
- DOUGLAS, W. W. & RUBIN, R. P. 1961. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol*, 159, 40-57.
- DRUSCHKY, A., SPITZER, A., PLATSCH, G., CLAUS, D., FEISTEL, H., DRUSCHKY, K., et al. 1999. Cardiac sympathetic denervation in early stages of amyotrophic lateral sclerosis demonstrated by 123I-MIBG-SPECT. *Acta Neurol Scand*, 99, 308-14.
- DUDKINA, N. V., HEINEMEYER, J., KEEGSTRA, W., BOEKEMA, E. J. & BRAUN, H. P. 2005. Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett*, 579, 5769-72.
- DUPUIS, L., OUDART, H., RENE, F., GONZALEZ DE AGUILAR, J. L. & LOEFFLER, J. P. 2004. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11159-64.
- DUPUIS, L., PRADAT, P. F., LUDOLPH, A. C. & LOEFFLER, J. P. 2011. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*, 10, 75-82.
- ECHANIZ-LAGUNA, A., ZOLL, J., PONSOT, E., N'GUESSAN, B., TRANCHANT, C., LOEFFLER, J. P., et al. 2006. Muscular mitochondrial function in amyotrophic lateral sclerosis is progressively altered as the disease develops: a temporal study in man. *Exp Neurol*, 198, 25-30.
- ELACHOURI, G., VIDONI, S., ZANNA, C., PATTYN, A., BOUKHADDAOUI, H., GAGET, K., et al. 2011. OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res*, 21, 12-20.
- ESTEVEZ, A. G., CROW, J. P., SAMPSON, J. B., REITER, C., ZHUANG, Y., RICHARDSON, G. J., et al. 1999. Induction of nitric oxide-dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science*, 286, 2498-500.
- EZZI, S. A., URUSHITANI, M. & JULIEN, J. P. 2007. Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J Neurochem*, 102, 170-8.
- FELDBERG, W., MINZ, B. & TSUDZIMURA, H. 1934. The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J Physiol*, 81, 286-304.

- FERRAIUOLO, L., KIRBY, J., GRIERSON, A. J., SENDTNER, M. & SHAW, P. J. 2011. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 7, 616-30.
- FERRAIUOLO, L., MEYER, K., SHERWOOD, T. W., VICK, J., LIKHTE, S., FRANKES, A., et al. 2016. Oligodendrocytes contribute to motor neuron death in ALS via SOD1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E6496-E6505.
- FERRI, A., FIORENZO, P., NENCINI, M., COZZOLINO, M., PESARESI, M. G., VALLE, C., et al. 2010. Glutaredoxin 2 prevents aggregation of mutant SOD1 in mitochondria and abolishes its toxicity. *Hum Mol Genet*, 19, 4529-42.
- FREZZA, C., CIPOLAT, S., MARTINS DE BRITO, O., MICARONI, M., BEZNOUSSENKO, G. V., RUDKA, T., et al. 2006. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, 126, 177-89.
- FUNALOT, B., DESPORT, J. C., STURTZ, F., CAMU, W. & COURATIER, P. 2009. High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*, 10, 113-7.
- GARCIA, A. G., GARCIA-DE-DIEGO, A. M., GANDIA, L., BORGES, R. & GARCIA-SANCHO, J. 2006. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev*, 86, 1093-131.
- GARCIA-SANCHO, J., DE DIEGO, A. M. & GARCIA, A. G. 2012. Mitochondria and chromaffin cell function. *Pflugers Arch*, 464, 33-41.
- GAUTAM, M., JARA, J. H., SEKERKOVA, G., YASVOINA, M. V., MARTINA, M. & OZDINLER, P. H. 2016. Absence of alsin function leads to corticospinal motor neuron vulnerability via novel disease mechanisms. *Hum Mol Genet*, 25, 1074-87.
- GEEVASINGA, N., HOWELLS, J., MENON, P., VAN DEN BOS, M., SHIBUYA, K., MATAMALA, J. M., et al. 2019. Amyotrophic lateral sclerosis diagnostic index: Toward a personalized diagnosis of ALS. *Neurology*, 92, e536-e547.
- GLASS, J. D., HERTZBERG, V. S., BOULIS, N. M., RILEY, J., FEDERICI, T., POLAK, M., et al. 2016. Transplantation of spinal cord-derived neural stem cells for ALS: Analysis of phase 1 and 2 trials. *Neurology*, 87, 392-400.
- GLYTSOU, C., CALVO, E., COGLIATI, S., MEHROTRA, A., ANASTASIA, I., RIGONI, G., et al. 2016. Optic Atrophy 1 Is Epistatic to the Core MICOS Component MIC60 in Mitochondrial Cristae Shape Control. *Cell Rep*, 17, 3024-3034.
- GOLDSTEIN, L. H. & ABRAHAM, S. 2013. Changes in cognition and behaviour in amyotrophic lateral sclerosis: nature of impairment and implications for assessment. *Lancet Neurol*, 12, 368-80.
- GRAFFMO, K. S., FORSBERG, K., BERGH, J., BIRVE, A., ZETTERSTROM, P., ANDERSEN, P. M., et al. 2013. Expression of wild-type human superoxide dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, 22, 51-60.
- GREENE, L. A. & TISCHLER, A. S. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 2424-8.
- GRIPARIC, L., KANAZAWA, T. & VAN DER BLIEK, A. M. 2007. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol*, 178, 757-64.
- GRIPARIC, L., VAN DER WEL, N. N., OROZCO, I. J., PETERS, P. J. & VAN DER BLIEK, A. M. 2004. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem*, 279, 18792-8.
- GROS-LOUIS, F., SOUCY, G., LARIVIERE, R. & JULIEN, J. P. 2010. Intracerebroventricular infusion of monoclonal antibody or its derived Fab fragment against misfolded forms of SOD1 mutant delays mortality in a mouse model of ALS. *J Neurochem*, 113, 1188-99.
- GUARESCHI, S., COVA, E., CEREDA, C., CERONI, M., DONETTI, E., BOSCO, D. A., et al. 2012. An over-oxidized form of superoxide dismutase found in sporadic amyotrophic lateral sclerosis with bulbar onset shares a toxic mechanism with mutant SOD1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 5074-9.
- GUEGAN, C., VILA, M., ROSOKLIJA, G., HAYS, A. P. & PRZEDBORSKI, S. 2001. Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, 21, 6569-76.
- GURNEY, M. E., PU, H., CHIU, A. Y., DAL CANTO, M. C., POLCHOW, C. Y., ALEXANDER, D. D., et al. 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264, 1772-5.
- HACKENBROCK, C. R. 1966. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol*, 30, 269-97.
- HADDAD, J. J. 2002. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal*, 14, 879-97.

- HAIDET-PHILLIPS, A. M., HESTER, M. E., MIRANDA, C. J., MEYER, K., BRAUN, L., FRANKES, A., et al. 2011. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol*, 29, 824-8.
- HARDIMAN, O., AL-CHALABI, A., CHIO, A., CORR, E. M., LOGROSCINO, G., ROBBERECHT, W., et al. 2017. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17071.
- HARNER, M., KORNER, C., WALTHER, D., MOKRANJAC, D., KAESMACHER, J., WELSCH, U., et al. 2011. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J*, 30, 4356-70.
- HARTL, F. U., BRACHER, A. & HAYER-HARTL, M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475, 324-32.
- HATAZAWA, J., BROOKS, R. A., DALAKAS, M. C., MANSI, L. & DI CHIRO, G. 1988. Cortical motor-sensory hypometabolism in amyotrophic lateral sclerosis: a PET study. *J Comput Assist Tomogr*, 12, 630-6.
- HIGGINS, C. M., JUNG, C., DING, H. & XU, Z. 2002. Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci*, 22, RC215.
- HIGGINS, C. M., JUNG, C. & XU, Z. 2003. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci*, 4, 16.
- HIRANO, A., NAKANO, I., KURLAND, L. T., MULDER, D. W., HOLLEY, P. W. & SACCOMANNO, G. 1984. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 43, 471-80.
- HOPPIN, S., COLLINS, S. R., CASSIDY-STONE, A., HUMMEL, E., DEVAY, R. M., LACKNER, L. L., et al. 2011. A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J Cell Biol*, 195, 323-40.
- HORVATH, S. E. & DAUM, G. 2013. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res*, 52, 590-614.
- HUDSON, G., AMATI-BONNEAU, P., BLAKELY, E. L., STEWART, J. D., HE, L., SCHAEFER, A. M., et al. 2008. Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain*, 131, 329-37.
- INCE, P., STOUT, N., SHAW, P., SLADE, J., HUNZIKER, W., HEIZMANN, C. W., et al. 1993. Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 19, 291-9.
- IOAKEIMIDIS, F., OTT, C., KOZJAK-PAVLOVIC, V., VIOLITZI, F., RINOTAS, V., MAKRINO, E., et al. 2014. A splicing mutation in the novel mitochondrial protein DNAJC11 causes motor neuron pathology associated with cristae disorganization, and lymphoid abnormalities in mice. *PLoS One*, 9, e104237.
- ISHIHARA, N., EURA, Y. & MIHARA, K. 2004. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci*, 117, 6535-46.
- ISHIHARA, N., FUJITA, Y., OKA, T. & MIHARA, K. 2006. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J*, 25, 2966-77.
- ISRAELSON, A., ARBEL, N., DA CRUZ, S., ILIEVA, H., YAMANAKA, K., SHOSHAN-BARMATZ, V., et al. 2010. Misfolded mutant SOD1 directly inhibits VDAC1 conductance in a mouse model of inherited ALS. *Neuron*, 67, 575-87.
- ITOH, T., SOBUE, G., KEN, E., MITSUMA, T., TAKAHASHI, A. & TROJANOWSKI, J. Q. 1992. Phosphorylated high molecular weight neurofilament protein in the peripheral motor, sensory and sympathetic neuronal perikarya: system-dependent normal variations and changes in amyotrophic lateral sclerosis and multiple system atrophy. *Acta Neuropathol*, 83, 240-5.
- JAARSMA, D., HAASDIJK, E. D., GRASHORN, J. A., HAWKINS, R., VAN DUIJN, W., VERSPAGET, H. W., et al. 2000. Human Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. *Neurobiol Dis*, 7, 623-43.
- JAWAID, A., MURTHY, S. B., WILSON, A. M., QURESHI, S. U., AMRO, M. J., WHEATON, M., et al. 2010. A decrease in body mass index is associated with faster progression of motor symptoms and shorter survival in ALS. *Amyotroph Lateral Scler*, 11, 542-8.
- JIN, S. M. & YOULE, R. J. 2012. PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *J Cell Sci*, 125, 795-9.
- JOHN, G. B., SHANG, Y., LI, L., RENKEN, C., MANNELLA, C. A., SELKER, J. M., et al. 2005. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell*, 16, 1543-54.
- JOMOVA, K., VONDRAKOVA, D., LAWSON, M. & VALKO, M. 2010. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem*, 345, 91-104.

- JUNG, C., HIGGINS, C. M. & XU, Z. 2002. Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 83, 535-45.
- KANDINOV, B., DRORY, V. E., TORDJMAN, K. & KORCZYN, A. D. 2012. Blood pressure measurements in a transgenic SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*, 13, 509-13.
- KANDINOV, B., GRIGORIADIS, N. C., TOULOUMI, O., DRORY, V. E., OFFEN, D. & KORCZYN, A. D. 2013. Immunohistochemical analysis of sympathetic involvement in the SOD1-G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 14, 424-33.
- KANDINOV, B., KORCZYN, A. D., RABINOWITZ, R., NEFUSSY, B. & DRORY, V. E. 2011. Autonomic impairment in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Auton Neurosci*, 159, 84-9.
- KANE, M. S., ALBAN, J., DESQUIRET-DUMAS, V., GUEGUEN, N., ISHAK, L., FERRE, M., et al. 2017. Autophagy controls the pathogenicity of OPA1 mutations in dominant optic atrophy. *J Cell Mol Med*, 21, 2284-2297.
- KARBOWSKI, M. & YOULE, R. J. 2003. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ*, 10, 870-80.
- KAWAMATA, H. & MANFREDI, G. 2008. Different regulation of wild-type and mutant Cu,Zn superoxide dismutase localization in mammalian mitochondria. *Hum Mol Genet*, 17, 3303-17.
- KAWATA, M., YURI, K. & MORIMOTO, M. 1994. Steroid hormone effects on gene expression, neuronal structure, and differentiation. *Horm Behav*, 28, 477-82.
- KAZMIERCZAK, B., KUZMA-KOZAKIEWICZ, M., USAREK, E. & BARANCZYK-KUZMA, A. 2011. Differences in glutathione S-transferase pi expression in transgenic mice with symptoms of neurodegeneration. *Acta Biochim Pol*, 58, 621-6.
- KIERNAN, M. C., VUCIC, S., CHEAH, B. C., TURNER, M. R., EISEN, A., HARDIMAN, O., et al. 2011. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 377, 942-55.
- KIKUCHI, H., ALMER, G., YAMASHITA, S., GUEGAN, C., NAGAI, M., XU, Z., et al. 2006. Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6025-30.
- KIRA, Y., SATO, E. F. & INOUE, M. 2002. Association of Cu,Zn-type superoxide dismutase with mitochondria and peroxisomes. *Arch Biochem Biophys*, 399, 96-102.
- KIRBY, J., HALLIGAN, E., BAPTISTA, M. J., ALLEN, S., HEATH, P. R., HOLDEN, H., et al. 2005. Mutant SOD1 alters the motor neuronal transcriptome: implications for familial ALS. *Brain*, 128, 1686-706.
- KIRKINEZOS, I. G., BACMAN, S. R., HERNANDEZ, D., OCA-COSSIO, J., ARIAS, L. J., PEREZ-PINZON, M. A., et al. 2005. Cytochrome c association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice. *J Neurosci*, 25, 164-72.
- KISLINGER, T., COX, B., KANNAN, A., CHUNG, C., HU, P., IGNATCHENKO, A., et al. 2006. Global survey of organ and organelle protein expression in mouse: combined proteomic and transcriptomic profiling. *Cell*, 125, 173-86.
- KLUGE, M. A., FETTERMAN, J. L. & VITA, J. A. 2013. Mitochondria and endothelial function. *Circ Res*, 112, 1171-88.
- KONG, J. & XU, Z. 1998. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci*, 18, 3241-50.
- KOZJAK-PAVLOVIC, V. 2017. The MICOS complex of human mitochondria. *Cell Tissue Res*, 367, 83-93.
- LAFORGE, M., RODRIGUES, V., SILVESTRE, R., GAUTIER, C., WEIL, R., CORTI, O., et al. 2016. NF-kappaB pathway controls mitochondrial dynamics. *Cell Death Differ*, 23, 89-98.
- LEE, B., AHN, Y., KANG, S. M., PARK, Y., JEON, Y. J., RHO, J. M., et al. 2015. Stoichiometric expression of mtHsp40 and mtHsp70 modulates mitochondrial morphology and cristae structure via Opa1L cleavage. *Mol Biol Cell*, 26, 2156-67.
- LEE, H. & YOON, Y. 2018. Mitochondrial Membrane Dynamics-Functional Positioning of OPA1. *Antioxidants (Basel)*, 7.
- LEE, S. & KIM, H. J. 2015. Prion-like Mechanism in Amyotrophic Lateral Sclerosis: are Protein Aggregates the Key? *Exp Neurobiol*, 24, 1-7.
- LIESA, M., PALACIN, M. & ZORZANO, A. 2009. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev*, 89, 799-845.
- LIGON, L. A. & STEWARD, O. 2000. Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol*, 427, 351-61.
- LIM, D. Y., JANG, S. J. & PARK, D. G. 2002. Comparison of catecholamine release in the isolated adrenal glands of SHR and WKY rats. *Auton Autacoid Pharmacol*, 22, 225-32.

- LIN, M. T. & BEAL, M. F. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787-95.
- LINGLE, C. J., MARTINEZ-ESPINOSA, P. L., GUARINA, L. & CARBONE, E. 2018. Roles of Na(+), Ca(2+), and K(+) channels in the generation of repetitive firing and rhythmic bursting in adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch*, 470, 39-52.
- LIU, D., WEN, J., LIU, J. & LI, L. 1999. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB J*, 13, 2318-28.
- LIU, J., LILLO, C., JONSSON, P. A., VANDE VELDE, C., WARD, C. M., MILLER, T. M., et al. 2004. Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron*, 43, 5-17.
- LIU, W., YAMASHITA, T., TIAN, F., MORIMOTO, N., IKEDA, Y., DEGUCHI, K., et al. 2013. Mitochondrial fusion and fission proteins expression dynamically change in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Neurovasc Res*, 10, 222-30.
- LOIZZO, S., PIERI, M., FERRI, A., CARRI, M. T., ZONA, C., FORTUNA, A., et al. 2010. Dynamic NAD(P)H post-synaptic autofluorescence signals for the assessment of mitochondrial function in a neurodegenerative disease: monitoring the primary motor cortex of G93A mice, an amyotrophic lateral sclerosis model. *Mitochondrion*, 10, 108-14.
- LOMEN-HOERTH, C., ANDERSON, T. & MILLER, B. 2002. The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology*, 59, 1077-9.
- LOW, P. A., AHLISKOG, J. E., PETERSEN, R. C., WARING, S. C., ESTEBAN-SANTILLAN, C. & KURLAND, L. T. 1997. Autonomic failure in Guamanian neurodegenerative disease. *Neurology*, 49, 1031-4.
- LUTZ, C. 2018. Mouse models of ALS: Past, present and future. *Brain Res*, 1693, 1-10.
- MACKENZIE, I. R. 2007. The neuropathology of FTD associated With ALS. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 21, S44-9.
- MACKENZIE, K. D., DUFFIELD, M. D., PEIRIS, H., PHILLIPS, L., ZANIN, M. P., TEO, E. H., et al. 2014. Huntingtin-associated protein 1 regulates exocytosis, vesicle docking, readily releasable pool size and fusion pore stability in mouse chromaffin cells. *J Physiol*, 592, 1505-18.
- MAGRANE, J. & MANFREDI, G. 2009. Mitochondrial function, morphology, and axonal transport in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 11, 1615-26.
- MAKER, H., CLARKE, D. & LAJTHA, A. 1976. Intermediary metabolism of carbohydrates and amino acids. *Basic Neurochemistry*, 279-307.
- MANCUSO, R. & NAVARRO, X. 2015. Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Prog Neurobiol*, 133, 1-26.
- MANNELLA, C. A. 2006. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta*, 1763, 542-8.
- MANNELLA, C. A., LEDERER, W. J. & JAFRI, M. S. 2013. The connection between inner membrane topology and mitochondrial function. *J Mol Cell Cardiol*, 62, 51-7.
- MANNELLA, C. A., MARKO, M. & BUTTLE, K. 1997. Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends Biochem Sci*, 22, 37-8.
- MANNELLA, C. A., MARKO, M., PENCZEK, P., BARNARD, D. & FRANK, J. 1994. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech*, 27, 278-83.
- MANNELLA, C. A., PFEIFFER, D. R., BRADSHAW, P. C., MORARU, II, SLEPCHENKO, B., LOEW, L. M., et al. 2001. Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life*, 52, 93-100.
- MARTINEZ-RAMIREZ, C., BARAIBAR, A. M., NANCLARES, C., MENDEZ-LOPEZ, I., GOMEZ, A., MUNOZ, M. P., et al. 2018. Altered excitability and exocytosis in chromaffin cells from the R6/1 mouse model of Huntington's disease is linked to over-expression of mutated huntingtin. *J Neurochem*, 147, 454-476.
- MATTIAZZI, M., D'AURELIO, M., GAJEWSKI, C. D., MARTUSHOVA, K., KIAEI, M., BEAL, M. F., et al. 2002. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem*, 277, 29626-33.
- MATUS, S., MEDINAS, D. B. & HETZ, C. 2014. Common ground: stem cell approaches find shared pathways underlying ALS. *Cell Stem Cell*, 14, 697-9.
- MCBRIDE, H. M., NEUSPIEL, M. & WASIAK, S. 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol*, 16, R551-60.
- MEEUSEN, S., DEVAY, R., BLOCK, J., CASSIDY-STONE, A., WAYSON, S., MCCAFFERY, J. M., et al. 2006. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell*, 127, 383-95.

- MENZIES, F. M., COOKSON, M. R., TAYLOR, R. W., TURNBULL, D. M., CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z. M., DONG, L., et al. 2002a. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 125, 1522-33.
- MENZIES, F. M., INCE, P. G. & SHAW, P. J. 2002b. Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Int*, 40, 543-51.
- MENZIES, R. A. & GOLD, P. H. 1971. The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats. *J Biol Chem*, 246, 2425-9.
- MILLARUELO, A. I., SAGARRA, M. R., DELICADO, E., TORRES, M. & MIRAS-PORTUGAL, M. T. 1986. Enzymes and pathways of glucose utilization in bovine adrenal medulla. *Mol Cell Biochem*, 70, 67-76.
- MILLER, R. G., MITCHELL, J. D. & MOORE, D. H. 2012. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*, CD001447.
- MILLET, A. M., BERTHOLET, A. M., DALOYAU, M., REYNIER, P., GALINIER, A., DEVIN, A., et al. 2016. Loss of functional OPA1 unbalances redox state: implications in dominant optic atrophy pathogenesis. *Ann Clin Transl Neurol*, 3, 408-21.
- MINAURO-SANMIGUEL, F., WILKENS, S. & GARCIA, J. J. 2005. Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 12356-8.
- MIRANDA-FERREIRA, R., DE PASCUAL, R., DE DIEGO, A. M., CARICATI-NETO, A., GANDIA, L., JURKIEWICZ, A., et al. 2008. Single-vesicle catecholamine release has greater quantal content and faster kinetics in chromaffin cells from hypertensive, as compared with normotensive, rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 324, 685-93.
- MISHRA, P., CARELLI, V., MANFREDI, G. & CHAN, D. C. 2014. Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab*, 19, 630-41.
- MITCHELL, P. 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science*, 206, 1148-59.
- MIWA, S. & BRAND, M. D. 2003. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochem Soc Trans*, 31, 1300-1.
- MOOTHA, V. K., BUNKENBORG, J., OLSEN, J. V., HJERRILD, M., WISNIEWSKI, J. R., STAHL, E., et al. 2003. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell*, 115, 629-40.
- MORRICE, J. R., GREGORY-EVANS, C. Y. & SHAW, C. A. 2017. Necroptosis in amyotrophic lateral sclerosis and other neurological disorders. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863, 347-353.
- MORRIS, R. L. & HOLLENBECK, P. J. 1995. Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol*, 131, 1315-26.
- MULLER-RISCHART, A. K., PILSL, A., BEAUDETTE, P., PATRA, M., HADIAN, K., FUNKE, M., et al. 2013. The E3 ligase parkin maintains mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination of NEMO. *Mol Cell*, 49, 908-21.
- MUNCH, C., O'BRIEN, J. & BERTOLOTTI, A. 2011. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 3548-53.
- MURPHY, M. P. & HARTLEY, R. C. 2018. Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nat Rev Drug Discov*.
- MUSIAL, D. C., BOMFIM, G. H., ARRANZ-TAGARRO, J. A., MENDEZ-LOPEZ, I., MIRANDA-FERREIRA, R., JURKIEWICZ, A., et al. 2017. Altered mitochondrial function, calcium signaling, and catecholamine release in chromaffin cells of diabetic and SHR rats. *Eur J Pharmacol*, 815, 416-426.
- NAPOLETANO, F., BARON, O., VANDENABEELE, P., MOLLEREAU, B. & FANTO, M. 2019. Intersections between Regulated Cell Death and Autophagy. *Trends Cell Biol*, 29, 323-338.
- NIJSEN, J., COMLEY, L. H. & HEDLUND, E. 2017. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 133, 863-885.
- NUBLING, G. S., MIE, E., BAUER, R. M., HENSLER, M., LORENZL, S., HAPFELMEIER, A., et al. 2014. Increased prevalence of bladder and intestinal dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 15, 174-9.
- O'REILLY, E. J., WANG, H., WEISSKOPF, M. G., FITZGERALD, K. C., FALCONE, G., MCCULLOUGH, M. L., et al. 2013. Premorbid body mass index and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 14, 205-11.
- O'ROURKE, B., CORTASSA, S. & AON, M. A. 2005. Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. *Physiology (Bethesda)*, 20, 303-15.

- OEY, P. L., VOS, P. E., WIENEKE, G. H., WOKKE, J. H., BLANKESTIJN, P. J. & KAREMAKER, J. M. 2002. Subtle involvement of the sympathetic nervous system in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*, 25, 402-8.
- OH, K. W., NOH, M. Y., KWON, M. S., KIM, H. Y., OH, S. I., PARK, J., et al. 2018. Repeated Intrathecal Mesenchymal Stem Cells for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol*, 84, 361-373.
- OKADO-MATSUMOTO, A. & FRIDOVICH, I. 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem*, 276, 38388-93.
- OKADO-MATSUMOTO, A. & FRIDOVICH, I. 2002. Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 9010-4.
- OLICHON, A., BARICAULT, L., GAS, N., GUILLOU, E., VALETTE, A., BELENGUER, P., et al. 2003. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*, 278, 7743-6.
- OLICHON, A., EMORINE, L. J., DESCOINS, E., PELLOQUIN, L., BRICHESE, L., GAS, N., et al. 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett*, 523, 171-6.
- ONESTO, E., COLOMBRITA, C., GUMINA, V., BORGHI, M. O., DUSI, S., DORETTI, A., et al. 2016. Gene-specific mitochondria dysfunctions in human TARDBP and C9ORF72 fibroblasts. *Acta Neuropathol Commun*, 4, 47.
- ONG, S. B., SUBRAYAN, S., LIM, S. Y., YELLON, D. M., DAVIDSON, S. M. & HAUSENLOY, D. J. 2010. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 121, 2012-22.
- OSMAN, C., VOELKER, D. R. & LANGER, T. 2011. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol*, 192, 7-16.
- OTT, C., ROSS, K., STRAUB, S., THIEDE, B., GOTZ, M., GOOSMANN, C., et al. 2012. Sam50 functions in mitochondrial intermembrane space bridging and biogenesis of respiratory complexes. *Mol Cell Biol*, 32, 1173-88.
- PAGANI, M., CHIO, A., VALENTINI, M. C., OBERG, J., NOBILI, F., CALVO, A., et al. 2014. Functional pattern of brain FDG-PET in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 83, 1067-74.
- PALADE, G. E. 1952. The fine structure of mitochondria. *Anat Rec*, 114, 427-51.
- PALADE, G. E. 1953. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem*, 1, 188-211.
- PALMER, C. S., OSELLAME, L. D., STOJANOVSKI, D. & RYAN, M. T. 2011. The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal*, 23, 1534-45.
- PARAKH, S., SPENCER, D. M., HALLORAN, M. A., SOO, K. Y. & ATKIN, J. D. 2013. Redox regulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 408681.
- PARK, J. H., HONG, Y. H., KIM, H. J., KIM, S. M., KIM, M. J., PARK, K. S., et al. 2007. Pyruvate slows disease progression in a G93A SOD1 mutant transgenic mouse model. *Neurosci Lett*, 413, 265-9.
- PARK, Y. Y., LEE, S., KARBOWSKI, M., NEUTZNER, A., YOULE, R. J. & CHO, H. 2010. Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *J Cell Sci*, 123, 619-26.
- PARSONS, M. J. & GREEN, D. R. 2010. Mitochondria in cell death. *Essays Biochem*, 47, 99-114.
- PASINELLI, P., BELFORD, M. E., LENNON, N., BACSKAI, B. J., HYMAN, B. T., TROTTI, D., et al. 2004. Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron*, 43, 19-30.
- PASINELLI, P. & BROWN, R. H. 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci*, 7, 710-23.
- PASINELLI, P., HOUSEWEART, M. K., BROWN, R. H., JR. & CLEVELAND, D. W. 2000. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13901-6.
- PAUMARD, P., VAILLIER, J., COULARY, B., SCHAEFFER, J., SOUBANNIER, V., MUELLER, D. M., et al. 2002. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J*, 21, 221-30.
- PEDRINI, S., SAU, D., GUARESCHI, S., BOGUSH, M., BROWN, R. H., JR., NANICHE, N., et al. 2010. ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Hum Mol Genet*, 19, 2974-86.
- PEHAR, M., BEESON, G., BEESON, C. C., JOHNSON, J. A. & VARGAS, M. R. 2014. Mitochondria-targeted catalase reverts the neurotoxicity of hSOD1G(9)(3)A astrocytes without extending the survival of ALS-linked mutant hSOD1 mice. *PLoS One*, 9, e103438.

- PERKINS, G., RENKEN, C., MARTONE, M. E., YOUNG, S. J., ELLISMAN, M. & FREY, T. 1997. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol*, 119, 260-72.
- PERKINS, G. A. & FREY, T. G. 2000. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron*, 31, 97-111.
- PERKINS, G. A., TJONG, J., BROWN, J. M., POQUIZ, P. H., SCOTT, R. T., KOLSON, D. R., et al. 2010. The micro-architecture of mitochondria at active zones: electron tomography reveals novel anchoring scaffolds and cristae structured for high-rate metabolism. *J Neurosci*, 30, 1015-26.
- PERNAS, L. & SCORRANO, L. 2016. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol*, 78, 505-31.
- PETER, R. S., ROSENBOHM, A., DUPUIS, L., BREHME, T., KASSUBEK, J., ROTHENBACHER, D., et al. 2017. Life course body mass index and risk and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis: results from the ALS registry Swabia. *Eur J Epidemiol*, 32, 901-908.
- PETROU, P., GOTHELF, Y., ARGOV, Z., GOTKINE, M., LEVY, Y. S., KASSIS, I., et al. 2016. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials. *JAMA Neurol*, 73, 337-44.
- PETROV, D., MANSFIELD, C., MOUSSY, A. & HERMINE, O. 2017. ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? *Front Aging Neurosci*, 9, 68.
- PFANNER, N., VAN DER LAAN, M., AMATI, P., CAPALDI, R. A., CAUDY, A. A., CHACINSKA, A., et al. 2014. Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J Cell Biol*, 204, 1083-6.
- PHILBERT, M. A., BEISWANGER, C. M., MANSON, M. M., GREEN, J. A., NOVAK, R. F., PRIMIANO, T., et al. 1995. Glutathione S-transferases and gamma-glutamyl transpeptidase in the rat nervous systems: a basis for differential susceptibility to neurotoxicants. *Neurotoxicology*, 16, 349-62.
- PHILIPS, T. & ROTHSTEIN, J. D. 2015. Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol*, 69, 5 67 1-21.
- PHUKAN, J., ELAMIN, M., BEDE, P., JORDAN, N., GALLAGHER, L., BYRNE, S., et al. 2012. The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83, 102-8.
- PICCIONE, E. A., SLETTEN, D. M., STAFF, N. P. & LOW, P. A. 2015. Autonomic system and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*, 51, 676-9.
- PICKLES, S. & VANDE VELDE, C. 2012. Misfolded SOD1 and ALS: zeroing in on mitochondria. *Amyotroph Lateral Scler*, 13, 333-40.
- PLATTNER, H., ARTALEJO, A. R. & NEHER, E. 1997. Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J Cell Biol*, 139, 1709-17.
- PLECITA-HLAVATA, L. & JEZEK, P. 2016. Integration of superoxide formation and cristae morphology for mitochondrial redox signaling. *Int J Biochem Cell Biol*, 80, 31-50.
- PODVIN, S., BUNDEY, R., TONEFF, T., ZIEGLER, M. & HOOK, V. 2015. Profiles of secreted neuropeptides and catecholamines illustrate similarities and differences in response to stimulation by distinct secretagogues. *Mol Cell Neurosci*, 68, 177-85.
- QUINTANA-CABRERA, R., MEHROTRA, A., RIGONI, G. & SORIANO, M. E. 2018. Who and how in the regulation of mitochondrial cristae shape and function. *Biochem Biophys Res Commun*, 500, 94-101.
- RAINBOLT, T. K., LEBEAU, J., PUCHADES, C. & WISEMAN, R. L. 2016. Reciprocal Degradation of YME1L and OMA1 Adapts Mitochondrial Proteolytic Activity during Stress. *Cell Rep*, 14, 2041-2049.
- RAKHIT, R., CUNNINGHAM, P., FURTOS-MATEI, A., DAHAN, S., QI, X. F., CROW, J. P., et al. 2002. Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 277, 47551-6.
- RAMAN, R., ALLEN, S. P., GOODALL, E. F., KRAMER, S., PONGER, L. L., HEATH, P. R., et al. 2015. Gene expression signatures in motor neurone disease fibroblasts reveal dysregulation of metabolism, hypoxia-response and RNA processing functions. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 41, 201-26.
- RAMPELT, H., BOHNERT, M., ZERBES, R. M., HORVATH, S. E., WARSCHIED, B., PFANNER, N., et al. 2017a. Mic10, a Core Subunit of the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System, Interacts with the Dimeric F1Fo-ATP Synthase. *J Mol Biol*, 429, 1162-1170.
- RAMPELT, H. & VAN DER LAAN, M. 2017. The Yin & Yang of Mitochondrial Architecture - Interplay of MICOS and F1Fo-ATP synthase in cristae formation. *Microb Cell*, 4, 236-239.

- RAMPELT, H., ZERBES, R. M., VAN DER LAAN, M. & PFANNER, N. 2017b. Role of the mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864, 737-746.
- REICHERT, A. S. & NEUPERT, W. 2002. Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim Biophys Acta*, 1592, 41-9.
- RENTON, A. E., MAJOUNIE, E., WAITE, A., SIMON-SANCHEZ, J., ROLLINSON, S., GIBBS, J. R., et al. 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72, 257-68.
- RICHARDSON, K., ALLEN, S. P., MORTIBOYS, H., GRIERSON, A. J., WHARTON, S. B., INCE, P. G., et al. 2013. The effect of SOD1 mutation on cellular bioenergetic profile and viability in response to oxidative stress and influence of mutation-type. *PLoS One*, 8, e68256.
- RIPPS, M. E., HUNTLEY, G. W., HOF, P. R., MORRISON, J. H. & GORDON, J. W. 1995. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 689-93.
- ROMANELLO, V., GUADAGNIN, E., GOMES, L., RODER, I., SANDRI, C., PETERSEN, Y., et al. 2010. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J*, 29, 1774-85.
- ROSEN, D. R., SIDDIQUE, T., PATTERSON, D., FIGLEWICZ, D. A., SAPP, P., HENTATI, A., et al. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362, 59-62.
- ROTUNNO, M. S., AUCLAIR, J. R., MANIATIS, S., SHAFFER, S. A., AGAR, J. & BOSCO, D. A. 2014. Identification of a misfolded region in superoxide dismutase 1 that is exposed in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 289, 28527-38.
- ROTUNNO, M. S. & BOSCO, D. A. 2013. An emerging role for misfolded wild-type SOD1 in sporadic ALS pathogenesis. *Front Cell Neurosci*, 7, 253.
- SABADO, J., CASANOVAS, A., TARABAL, O., HEREU, M., PIEDRAFITA, L., CALDERO, J., et al. 2014. Accumulation of misfolded SOD1 in dorsal root ganglion degenerating proprioceptive sensory neurons of transgenic mice with amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int*, 2014, 852163.
- SACHS, C., CONRADI, S. & KAIJSER, L. 1985. Autonomic function in amyotrophic lateral sclerosis: a study of cardiovascular responses. *Acta Neurol Scand*, 71, 373-8.
- SARLETTE, A., KRAMPFL, K., GROTHE, C., NEUHOF, N., DENGLER, R. & PETRI, S. 2008. Nuclear erythroid 2-related factor 2-antioxidative response element signaling pathway in motor cortex and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67, 1055-62.
- SARZI, E., ANGEBAULT, C., SEVENO, M., GUEGUEN, N., CHAIX, B., BIELICKI, G., et al. 2012. The human OPA1delTTAG mutation induces premature age-related systemic neurodegeneration in mouse. *Brain*, 135, 3599-613.
- SASAKI, S. & IWATA, M. 1996. Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 204, 53-6.
- SASAKI, S. & IWATA, M. 2007. Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66, 10-6.
- SASAKI, S., WARITA, H., MURAKAMI, T., ABE, K. & IWATA, M. 2004. Ultrastructural study of mitochondria in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol*, 107, 461-74.
- SCHON, E. A. & PRZEDBORSKI, S. 2011. Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron*, 70, 1033-53.
- SCORRANO, L., ASHIYA, M., BUTTLE, K., WEILER, S., OAKES, S. A., MANNELLA, C. A., et al. 2002. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell*, 2, 55-67.
- SENA, L. A. & CHANDEL, N. S. 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*, 48, 158-67.
- SEREDENINA, T., NAYERNIA, Z., SORCE, S., MAGHZAL, G. J., FILIPPOVA, A., LING, S. C., et al. 2016. Evaluation of NADPH oxidases as drug targets in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med*, 97, 95-108.
- SESAKI, H., SOUTHARD, S. M., YAFFE, M. P. & JENSEN, R. E. 2003. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell*, 14, 2342-56.
- SHAW, P. J. 2005. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76, 1046-57.
- SHIDOJI, Y., HAYASHI, K., KOMURA, S., OHISHI, N. & YAGI, K. 1999. Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun*, 264, 343-7.
- SHIMIZU, T., HAYASHI, H., KATO, S., HAYASHI, M., TANABE, H. & ODA, M. 1994. Circulatory collapse and sudden death in respirator-dependent amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 124, 45-55.

- SHIMIZU, T., KAWATA, A., KATO, S., HAYASHI, M., TAKAMOTO, K., HAYASHI, H., et al. 2000. Autonomic failure in ALS with a novel SOD1 gene mutation. *Neurology*, 54, 1534-7.
- SHINDER, G. A., LACOURSE, M. C., MINOTTI, S. & DURHAM, H. D. 2001. Mutant Cu/Zn-superoxide dismutase proteins have altered solubility and interact with heat shock/stress proteins in models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 276, 12791-6.
- SHINDO, K., SHIMOKAWA, C., WATANABE, H., IIDA, H., OHASHI, K., NITTA, K., et al. 2004. Chronological changes of sympathetic outflow to muscles in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 227, 79-84.
- SHIPP, E. L., CANTINI, F., BERTINI, I., VALENTINE, J. S. & BANCİ, L. 2003. Dynamic properties of the G93A mutant of copper-zinc superoxide dismutase as detected by NMR spectroscopy: implications for the pathology of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemistry*, 42, 1890-9.
- SMIRNOVA, E., GRIPARIC, L., SHURLAND, D. L. & VAN DER BLIEK, A. M. 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 12, 2245-56.
- SMITH, E. F., SHAW, P. J. & DE VOS, K. J. 2017. The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*.
- SOCHOR, M., GONZALEZ, A. M. & MCLEAN, P. 1984. Regulation of glucose metabolism in rat adrenal gland in alloxan-diabetes: the possible role of fructose 2,6-bisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 121, 8-13.
- SONG, Z., CHEN, H., FIKET, M., ALEXANDER, C. & CHAN, D. C. 2007. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol*, 178, 749-55.
- SOTELO-SILVEIRA, J. R., LEPANTO, P., ELIZONDO, V., HORJALES, S., PALACIOS, F., MARTINEZ-PALMA, L., et al. 2009. Axonal mitochondrial clusters containing mutant SOD1 in transgenic models of ALS. *Antioxid Redox Signal*, 11, 1535-45.
- ST-PIERRE, J., BUCKINGHAM, J. A., ROEBUCK, S. J. & BRAND, M. D. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*, 277, 44784-90.
- STANTON, R. C. 2012. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, 64, 362-9.
- STRAUSS, M., HOFHAUS, G., SCHRODER, R. R. & KUHLBRANDT, W. 2008. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J*, 27, 1154-60.
- STRIBL, C., SAMARA, A., TRUMBACH, D., PEIS, R., NEUMANN, M., FUCHS, H., et al. 2014. Mitochondrial dysfunction and decrease in body weight of a transgenic knock-in mouse model for TDP-43. *J Biol Chem*, 289, 10769-84.
- STURTZ, L. A., DIEKERT, K., JENSEN, L. T., LILL, R. & CULOTTA, V. C. 2001. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem*, 276, 38084-9.
- SUN, M. G., WILLIAMS, J., MUNOZ-PINEDO, C., PERKINS, G. A., BROWN, J. M., ELLISMAN, M. H., et al. 2007. Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis. *Nat Cell Biol*, 9, 1057-65.
- SUNDBERG, A. G., NILSSON, R., APPELKVIST, E. L. & DALLNER, G. 1993. Immunohistochemical localization of alpha and pi class glutathione transferases in normal human tissues. *Pharmacol Toxicol*, 72, 321-31.
- SUZUKI, M., JEONG, S. Y., KARBOWSKI, M., YOULE, R. J. & TJANDRA, N. 2003. The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J Mol Biol*, 334, 445-58.
- TAFURI, F., RONCHI, D., MAGRI, F., COMI, G. P. & CORTI, S. 2015. SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Front Cell Neurosci*, 9, 336.
- TAKEUCHI, H., KOBAYASHI, Y., YOSHIHARA, T., NIWA, J., DOYU, M., OHTSUKA, K., et al. 2002. Hsp70 and Hsp40 improve neurite outgrowth and suppress intracytoplasmic aggregate formation in cultured neuronal cells expressing mutant SOD1. *Brain Res*, 949, 11-22.
- TAN, W., NANICHE, N., BOGUSH, A., PEDRINI, S., TROTTI, D. & PASINELLI, P. 2013. Small peptides against the mutant SOD1/Bcl-2 toxic mitochondrial complex restore mitochondrial function and cell viability in mutant SOD1-mediated ALS. *J Neurosci*, 33, 11588-98.
- TANK, A. W. & LEE WONG, D. 2015. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr Physiol*, 5, 1-15.
- TEDESCHI, H. 2005. Old and new data, new issues: the mitochondrial DeltaPsi. *Biochim Biophys Acta*, 1709, 195-202.

- THOMSEN, G. M., GOWING, G., SVENDSEN, S. & SVENDSEN, C. N. 2014. The past, present and future of stem cell clinical trials for ALS. *Exp Neurol*, 262 Pt B, 127-37.
- TISCHLER, A. S. 2002. Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Ann N Y Acad Sci*, 971, 366-70.
- TOEPFER, M., FOLWACZNY, C., KLAUSER, A., RIEPL, R. L., MULLER-FELBER, W. & PONGRATZ, D. 1999. Gastrointestinal dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 1, 15-9.
- TSANG, C. K., LIU, Y., THOMAS, J., ZHANG, Y. & ZHENG, X. F. 2014. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat Commun*, 5, 3446.
- TURNER, B. J. & TALBOT, K. 2008. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol*, 85, 94-134.
- URBANI, A. & BELLUZZI, O. 2000. Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur J Neurosci*, 12, 3567-74.
- VALENTINE, J. S., DOUCETTE, P. A. & ZIT'TIN POTTER, S. 2005. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem*, 74, 563-93.
- VAN BLITTERSWIJK, M., DEJESUS-HERNANDEZ, M., NIEMANTSVERDRIET, E., MURRAY, M. E., HECKMAN, M. G., DIEHL, N. N., et al. 2013. Association between repeat sizes and clinical and pathological characteristics in carriers of C9ORF72 repeat expansions (Xpansize-72): a cross-sectional cohort study. *Lancet Neurol*, 12, 978-88.
- VAN DAMME, P., ROBBERECHT, W. & VAN DEN BOSCH, L. 2017. Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. *Dis Model Mech*, 10, 537-549.
- VAN DER LAAN, M., BOHNERT, M., WIEDEMANN, N. & PFANNER, N. 2012. Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis. *Trends Cell Biol*, 22, 185-92.
- VAN LAAR, V. S. & BERMAN, S. B. 2009. Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 218, 247-56.
- VAN LAERE, K., VANHEE, A., VERSCHUEREN, J., DE COSTER, L., DRIESEN, A., DUPONT, P., et al. 2014. Value of 18fluorodeoxyglucose-positron-emission tomography in amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study. *JAMA Neurol*, 71, 553-61.
- VANDE VELDE, C., MCDONALD, K. K., BOUKHEDIMI, Y., MCALONIS-DOWNES, M., LOBSIGER, C. S., BEL HADJ, S., et al. 2011. Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. *PLoS One*, 6, e22031.
- VANDE VELDE, C., MILLER, T. M., CASHMAN, N. R. & CLEVELAND, D. W. 2008. Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 4022-7.
- VANDOORNE, T., DE BOCK, K. & VAN DEN BOSCH, L. 2018. Energy metabolism in ALS: an underappreciated opportunity? *Acta Neuropathol*, 135, 489-509.
- VARABYOVA, A., TOPF, U., KWIATKOWSKA, P., WROBEL, L., KAUS-DROBEK, M. & CHACINSKA, A. 2013. Mia40 and MINOS act in parallel with Ccs1 in the biogenesis of mitochondrial Sod1. *FEBS J*, 280, 4943-59.
- VEHVILAINEN, P., KOISTINAHO, J. & GUNDARS, G. 2014. Mechanisms of mutant SOD1 induced mitochondrial toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci*, 8, 126.
- VENTURA-CLAPIER, R., GARNIER, A. & VEKSLER, V. 2008. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res*, 79, 208-17.
- VIELHABER, S., WINKLER, K., KIRCHES, E., KUNZ, D., BUCHNER, M., FEISTNER, H., et al. 1999. Visualization of defective mitochondrial function in skeletal muscle fibers of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 169, 133-9.
- VIJAYVERGIYA, C., BEAL, M. F., BUCK, J. & MANFREDI, G. 2005. Mutant superoxide dismutase 1 forms aggregates in the brain mitochondrial matrix of amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci*, 25, 2463-70.
- VON DER MALSBERG, K., MULLER, J. M., BOHNERT, M., OELJEKLAUS, S., KWIATKOWSKA, P., BECKER, T., et al. 2011. Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev Cell*, 21, 694-707.
- WALCZAK, J., DEBSKA-VIELHABER, G., VIELHABER, S., SZYMANSKI, J., CHARZYNSKA, A., DUSZYNSKI, J., et al. 2019. Distinction of sporadic and familial forms of ALS based on mitochondrial characteristics. *FASEB J*, 33, 4388-4403.
- WALLACE, D. C. 2010. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*, 51, 440-50.
- WANG, C. & YOULE, R. J. 2009. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet*, 43, 95-118.

- WANG, H., YI, J., LI, X., XIAO, Y., DHAKAL, K. & ZHOU, J. 2018. ALS-associated mutation SOD1(G93A) leads to abnormal mitochondrial dynamics in osteocytes. *Bone*, 106, 126-138.
- WANG, W., LI, L., LIN, W. L., DICKSON, D. W., PETRUCCELLI, L., ZHANG, T., et al. 2013. The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Hum Mol Genet*, 22, 4706-19.
- WANG, X., SU, B., LEE, H. G., LI, X., PERRY, G., SMITH, M. A., et al. 2009. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 29, 9090-103.
- WANG, Y., XU, E., MUSICH, P. R. & LIN, F. 2019. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure. *CNS Neurosci Ther*, 25, 816-824.
- WEISBERG, S. J., LYAKHOVETSKY, R., WERDIGER, A. C., GITLER, A. D., SOEN, Y. & KAGANOVICH, D. 2012. Compartmentalization of superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) aggregates determines their toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 15811-6.
- WESTERINK, R. H. & EWING, A. G. 2008. The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol (Oxf)*, 192, 273-85.
- WESTERMANN, B. 2002. Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep*, 3, 527-31.
- WIEDEMANN, F. R., MANFREDI, G., MAWRIN, C., BEAL, M. F. & SCHON, E. A. 2002. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem*, 80, 616-25.
- WIEDEMANN, F. R., WINKLER, K., KUZNETSOV, A. V., BARTELS, C., VIELHABER, S., FEISTNER, H., et al. 1998. Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*, 156, 65-72.
- WIJESEKERA, L. C. & LEIGH, P. N. 2009. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*, 4, 3.
- WILLIAMS, R. J. 2000. Mitochondria and chloroplasts: localized and delocalized bioenergetic transduction. *Trends Biochem Sci*, 25, 479.
- WILLIAMS, T. L., DAY, N. C., INCE, P. G., KAMBOJ, R. K. & SHAW, P. J. 1997. Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 42, 200-7.
- WOKKE, J. 1996. Riluzole. *Lancet*, 348, 795-9.
- WONG, E. D., WAGNER, J. A., SCOTT, S. V., OKREGLAK, V., HOLEWINSKE, T. J., CASSIDY-STONE, A., et al. 2003. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol*, 160, 303-11.
- WONG, M. & MARTIN, L. J. 2010. Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Hum Mol Genet*, 19, 2284-302.
- WONG, P. C., PARDO, C. A., BORCHELT, D. R., LEE, M. K., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., et al. 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, 14, 1105-16.
- WU, C. H., FALLINI, C., TICOZZI, N., KEAGLE, P. J., SAPP, P. C., PIOTROWSKA, K., et al. 2012. Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 488, 499-503.
- XIE, J., MARUSICH, M. F., SOUDA, P., WHITELEGGE, J. & CAPALDI, R. A. 2007. The mitochondrial inner membrane protein mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. *FEBS Lett*, 581, 3545-9.
- YAMANAKA, K., BOILLEE, S., ROBERTS, E. A., GARCIA, M. L., MCALONIS-DOWNES, M., MIKSE, O. R., et al. 2008. Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7594-9.
- YAMASHITA, A., KOIKE, Y., TAKAHASHI, A., HIRAYAMA, M., MURAKAMI, N. & SOBUE, G. 1997. Relationship between respiratory failure and plasma noradrenaline levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Auton Res*, 7, 173-7.
- YAROSH, W., MONSERRATE, J., TONG, J. J., TSE, S., LE, P. K., NGUYEN, K., et al. 2008. The molecular mechanisms of OPA1-mediated optic atrophy in Drosophila model and prospects for antioxidant treatment. *PLoS Genet*, 4, e6.
- ZHANG, J., LIN, A., POWERS, J., LAM, M. P., LOTZ, C., LIEM, D., et al. 2012. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: mitochondrial proteome design: from molecular identity to pathophysiological regulation. *J Gen Physiol*, 139, 395-406.
- ZICK, M., RABL, R. & REICHERT, A. S. 2009. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 5-19.
- ZOCCOLELLA, S., SANTAMATO, A. & LAMBERTI, P. 2009. Current and emerging treatments for amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 5, 577-95.

ANEXOS

Anexo 1: Clasificación de los principales genes implicados en ELA y el mecanismo asociado al desarrollo de la enfermedad. Mezcla de S. Mathis, 2019 y Hardiman O, Nature 2017

Denominación	Gen (proteína)	Mecanismo implicado
ALS1	SOD1 (superoxide dismutase 1)	Estrés oxidativo
ALS2	KIAA1563 (alsin)	Tráfico endosomal
ALS3	Desconocido	Desconocido
ALS4	SETX (senataxin)	Metabolismo RNA
ALS5	KIAA1840/SPG11 (spastacin)	Alteración lisosomal y transporte axonal
ALS6	FUS (RNA-binding protein FUS)	Metabolismo RNA
ALS7	Desconocido	Desconocido
ALS8	VAPB (vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C)	Estrés retículo endoplásmico
ALS9	ANG (angiogenin)	Metabolismo RNA
ALS10	TARDBP (TAR DNA-binding protein 43)	Metabolismo RNA
ALS11	FIG4 (polyphosphoinositide phosphatase)	Tráfico endosomal
ALS12	OPTN (optineurin)	Autofagia
ALS13	ATXN2 (ataxin 2)	Metabolismo RNA
ALS14	VCP (valosin-containing protein)	Autofagia
ALS15	UBQLN2 (ubiquilin-2)	UPS and Autofagia
ALS16	SIGMAR1 (sigma non-opioid intracellular receptor 1)	UPS and Autofagia
ALS17	CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B)	Tráfico endosomal
ALS18	PFN1 (profilin 1)	Citoesqueleto
ALS19	ERBB4 (receptor tyrosine-protein kinase erbB 4)	Desarrollo neuronal
ALS20	HNRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1)	Metabolismo RNA
ALS21	MATR3 (matrin 3)	Metabolismo RNA
ALS22	TUBA4A (tubulin α 4A)	Citoesqueleto
ALS23	ANXA11 (annexin A11)	Citocinesis
ALS-FTD1	C9orf72 (chromosome 9 open reading frame 72)	Metabolismo RNA y Autofagia
ALS-FTD2	CHCHD10 (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing 10)	Mantenimiento mitocondrial
ALS-FTD3	SQSTM1 (sequestosome 1)	Autofagia
ALS-FTD4	TBK1 (serine/threonine-protein kinase TBK1)	Autofagia

Anexo 2: Resumen de los principales compuestos probados en ensayo clínicos para el tratamiento de ELA, clasificados por su mecanismo de acción. Extraído de (Petrov et al., 2017)

Mecanismo acción	Compuesto	Fase ensayo clínico	Resultado
Anti-glutamatérgicos	Ceftriaxona	1-2; 3	Negativo
	Memantina	2-3	Negativo
	Riluzol	3	Mixto
	Talampanel	2	Negativo
Antinflamatorios	Celecoxib	2-3	Negativo
	Eritropoyetina	2; 3	Negativo
	Acetato de glatiramer	2; 2-3	Negativo
	Minociclina	1-2; 3	Negativo
	NP001	1; 2	Negativo
	Pioglitazona	2	Negativo
	Ácido valproico	3	Negativo
	Coencima Q10	2	Negativo
Antioxidantes	Creatina	2; 2-3; 3	Negativo
	Edavarone	2; 3	Mixto
	Dexpramipexole	2; 3	Negativo
Neuroprotectivos	Olesoxime	2-3	Negativo
	TCH346	2-3	Negativo
	Xaliproden	2; 3	Negativo
	BDNF	1-2; 3	Negativo
Factores neurotróficos	CNTF	1; 1-2; 2-3; 3	Negativo
	IGF-1	3	Negativo
Inhibidores CSF1R	Mastinib	2-3	Positivo
Otros	Litio	2; 2-3; 3	Negativo
	Tirasemtiv	2	Negativo
CSF1R, receptor 1 del factor estimulante de colonias.			

Anexo 3: Principales moléculas utilizadas como tratamiento experimental en pacientes con ELA (<https://alsnewstoday.com/experimental-treatments-als/>).

Molécula	Compañía	Mecanismo acción
H.P.Acthar Gel (Corticotropin)	Mallinckrodt Pharmaceuticals	Hormona adrenocorticotropica purificada. Los estudios sugieren que previene la neuroinflamación actuando sobre el sistema inmune
MN-166 (ibudilast)	MediciNova	Antinflamatoria y neuroprotectiva
GM604	Gervon	Péptido natural regulador maestro del sistema nervioso
AMX0035	Amylyx	Combinación de fenilbutirato de sodio y ácido taurosodeoxicólico. Reduce muerte celular e inflamación bloqueando vías celulares.
Gilenya (fingolimod)	ASL Therapy Development Institute	Inhibe señalización por el receptor de esfingosina1, mediador de inflamación. Aprobado para esclerosis múltiple.
IONIS-SOD1Rx (BIIB067)	Ionis Pharmaceuticals y Biogen	Reduce los niveles tóxicos de proteína SOD1
Orph-001 (arimoclomol)	Orphazyme y la Universidad de Miami	Actúa sobre las proteínas de choque térmico
AT-1501	Anelixis Therapeutics	Anticuerpo que bloquea la proteína CD40L en las células T, que se cree está sobreactivada en ELA y de esta manera bloque la neuroinflamación
NP001	Neuraltus	Destinado a reducir la inflamación inactivando los macrófagos
VM202	VM Bipharma	Es un plásmido con información para producir el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que mejora la supervivencia y crecimiento de las células nerviosas
Reldesemtiv	Cytokinetics	Es un activador de troponina, que actúa en su unión con el calcio. De esta manera aumenta la contractividad muscular.
Masitinib	AB Science	Inactiva proteínas tirosin cinasas en el sistema inmune, disminuyendo la inflamación.
NurOwn	BrainStorm Cell Therapeutics	Células madres mesenquimales obtenidas de pacientes que se modifican para promover el crecimiento nervioso y supervivencia
NSI-566	Neuralstem	Terapia con células madres derivadas de médula espinal, destinadas a nutrir, proteger y reparar las neuronas motoras de los pacientes
CNS10-NPC-GDNF	Cedars-Sinai	Células neurales progenitoras genéticamente modificadas para producir un factor de crecimiento llamado GDNF (factor neurotrófico derivado de glía)
Mexiletine		Destinado a tratar los calambres musculares, inhibiendo canales de sodio y disminuyendo la conducción del impulso nervioso

Anexo 4: Estrategias terapéuticas usando la mitocondria como diana para el tratamiento de patologías comunes. Extraído de (Murphy and Hartley, 2018).

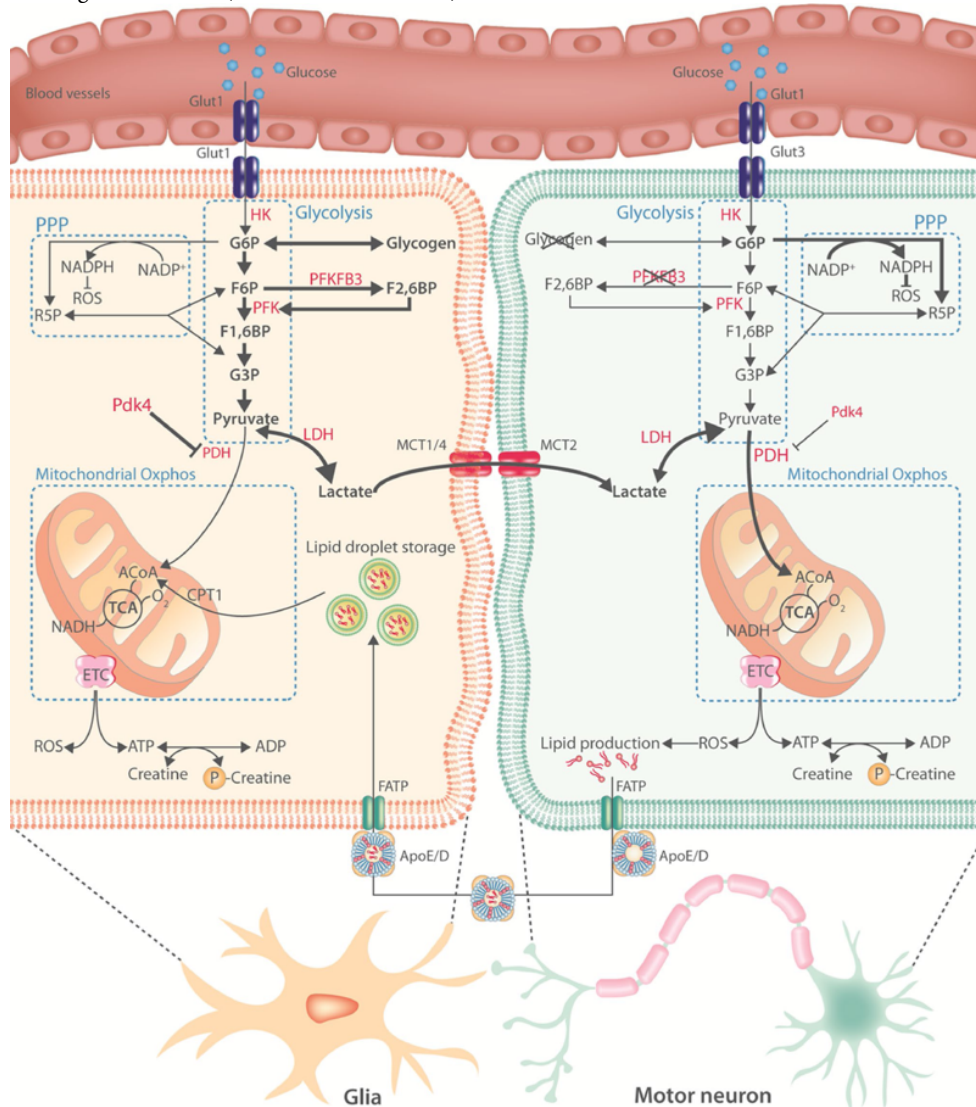
Grupo terapéutico	Compuesto	Mecanismo de acción	Enfermedad en estudio	Ensayo o modelos de estudio
Agentes protectores	Ciclosporina A	Bloquea MPTP	Infarto de miocardio	Fase III
	CoQ ₁₀	Antioxidante	Fallo cardíaco	Fase II
			Parkinson	Fase II
	MitoQ	Antioxidante	Enfermedad renal crónica	Enfermedad renal
			Hepatitis C	Fase II
			Infarto de miocardio	Fase II
	MTP-131 (Bendavia)	Desconocido	Disfunción mitocondrial del músculo esquelético asociado a la edad	Fase II
Biogénesis	AICAR	Activa AMPK (vía PCG1α)	Defectos en la fosforilación oxidativa	Modelos de miopatía
Dinámica mitocondrial	Midv1	Disminuye fisión mitocondrial (vía Drp1)		Modelos de excitotoxicidad
Control de calidad	Urolithin A	Aumenta la mitofagia	Función muscular	Modelos de fallo muscular asociado al envejecimiento
Señalización	NMN	Aumenta las reservas de NAD ⁺	Activa la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR)	Modelos de hígado graso
			Favorece vías NAD ⁺ dependientes	Modelos de alzheimer

AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide; AMPK, proteína cinasa activada por AMP; CoQ₁₀, coenzima Q10; DRP1, dynamin-related protein 1; Mdiv1, mitochondrial division inhibitor 1; MPTP, poro de permeabilidad mitocondrial transitorio; NMN, mononucleotido de nicotinamida; PGC1α, proteína 1α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas.

Anexo 5: Tratamientos metabólicos probados en ELA, tanto a nivel preclínico como a nivel clínico. En los casos clínicos, la mayoría ha utilizado el modelo de ratón SOD1^{G93A}. Para una revisión completa ver VANDORNE

Mecanismo de acción	Compuesto	Efecto en modelos de ELA	Efectos en pacientes ELA en estudio
Tampón y transporte energético	Creatina	Mejora esperanza de vida y función motora	Fase II/III – No eficacia
	CoQ ₁₀	Mejora esperanza de vida y función motora Reduce toxicidad de astrocitos SOD1 ^{G93A}	Fase II – No eficacia
	MitoQ	Mejora función motora, supervivencia e histopatología	No probado
Estrés oxidativo	Dexamipexole	Mejora supervivencia y función motora No eficacia en iPSCs	Fase III – No eficacia
	Edaravone	Retrasa síntomas motores y acumulación de SOD1 ^{G93A} en médula espinal Mejora función motora	Eficacia en un subgrupo de pacientes, aprobado por la FDA
	Dieta calórica	Retrasa el inicio de la enfermedad y extiende la supervivencia. También retrasa la pérdida de motoneurona en médula espinal	Fase II – Resultados prometedores
Aporte energético adicional	Cuerpos cetónicos	Retrasa el inicio de la enfermedad, mejora la supervivencia de motoneuronas, pero no la supervivencia del ratón.	No probado
	Triglicéridos de cadena mediana	Retrasa el inicio de la enfermedad, mejora la supervivencia de motoneuronas.	No probado
	Piruvato	Mejora la función motora, la progresión de la enfermedad y la esperanza de vida. No lo consigue en otros estudios.	No probado
Función mitocondrial	Dicloroacetato	Mejora supervivencia, retrasa inicio de enfermedad y mejora supervivencia motoneuronas.	No probado
	Acetil L-carnitina	Efectos neurotróficos y mejor la supervivencia	Fase II – Resultados prometedores

Anexo 6: Resumen del metabolismo de la glía y la motoneurona. Las vías metabólicas se señalan en azul, y los enzimas más importantes en rojo. Las líneas más gruesas indican las principales rutas metabólicas. Las neuronas presentan bajos depósitos de glicógeno y baja expresión y actividad de PFKB3, mientras que la actividad de PDH es mayor en neuronas que en glía. Esto provoca que el metabolismo predominante en neuronas sea el oxidativo y en la glía, el glicolítico. La glía suministra lactato a la neurona motora donde sufre la fosforilación oxidativa (hipótesis de la lanzadera de lactato astrocito-neurona). La generación de ROS en la neurona motora promueve la formación de lípidos, que se transportan a la glía donde se almacenan o catabolizan. Imagen tomada de (Vandoorne et al., 2018).



Glut	transportador de glucosa	Pdk4	piruvato deshidrogenasa cinasa 4
HK	hexokinasa	Oxphos	fosforilación oxidativa
G6P	glucosa 6-fosfato	MCT	transportador de monocarboxilato
R5P	ribosa 5-fosfato	ACoA	acetil coenzima A
F6P	fructosa 6-fosfato	CPT1 1	carnitina palmitoiltransferasa 1
PFK	osfofructocinasa	TCA	ciclo de los ácidos tricarboxílicos
PFKFB3	fosfofructocinasa-2/fructosa-2,6-bisfosfatasa	O₂	oxígeno molecular
F1,6BP	fructosa 1,6-bisfosfato	NADH	adenin dinucleotido de nicotinamida reducido
NADP+	adenin dinucleotido fosfato de nicotinamida oxidado	ETC	cadena de transporte electrónico
NADPH	adenin dinucleotido fosfato de nicotinamida reducido	FATP	proteína de transporte de ácidos
ROS	especies reactivas de oxígeno	APOE/D	E/D
G3P	gliceraldehido 3-fosfato	ATP	adenosin trifosfato
LDH	lactato deshidrogenasa	ADP	adenosin difosfato
PDH	piruvato deshidrogenasa		

